

Estudio genético funcional del gen *DAP1* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* que codifica un posible regulador de las enzimas citocromo P450 involucradas en la síntesis de carotenoides y de esteroides.

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

ANA MARÍA GONZÁLEZ SOTO

Enero, 2019

Director de Tesis: Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

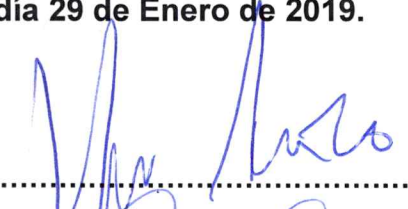
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

ANA MARÍA GONZÁLEZ SOTO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 29 de Enero de 2019.

Directora de Tesis:

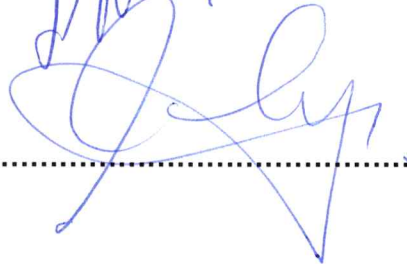
Dra. Jennifer Alcaíno Gorman



.....

Co-Director de Tesis

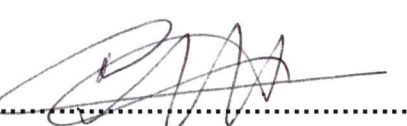
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán



.....

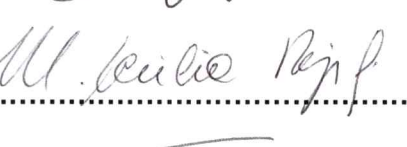
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Ricardo Cabrera



.....

Dra. María Cecilia Rojas



.....

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a todas las personas que de una u otra manera han aportado su granito de arena durante este proceso. En especial, va dedicada a Amalia, para que vea que el esfuerzo y el trabajo duro tiene sus recompensas.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los integrantes del Laboratorio de Genética por hacer que mi estadía haya sido tan amena y feliz. Gracias a Dony, Meli, Lucho y Sole por ser mis amigos y apoyarme durante todo este proceso. Gracias a Max y a Salva por ayudarme en el deporte, ser los principales partners en la organización de los almuerzos/cóctel/etc y por ayudarme siempre en cualquier cosa que necesitara. Espero que el contacto con ustedes no se pierda, y que cualquier cosa que necesiten de mi no duden en pedírmelo. Lo aprendido en este laboratorio no lo olvidaré nunca.

Gracias a la profe Jenny, por confiar en mí y ayudarme a ser una mejor investigadora. Todos los consejos que me ha dado me han servido muchísimo, y espero seguir mejorando ahora por mi cuenta.

Gracias a mi familia, en particular a mis hermanas Natalia y Fabiola, mi mamá, mi sobrinita Amalia y a mi pololo Igna. Sin ustedes como mi apoyo emocional no habría podido terminar esto nunca. Gracias nenas por todas las tonteras y risas idiotas, los pastelitos cuando estaba triste y por estar siempre conmigo. Gracias mamá por todo lo que me has dado y por ayudarme a ser mejor persona, no tengo palabras para expresar todo lo que has hecho, y sigues haciendo por mí y las nenas. Gracias Amalia, que a pesar de ser una bebecita, me escuchabas siempre tranquila cuando te contaba lo que había hecho en el día en el laboratorio hasta que te dormías, gracias por abrazarme y sonreír cuando estaba triste. Gracias a mi pololo Igna por estar siempre conmigo y motivarme a superarme en todos los aspectos de mi vida. Te amo muchísimo, y espero que todos los planes que tenemos juntos se realicen.

Gracias finalmente al FONDECYT 1160202 por el financiamiento durante esta etapa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
Microorganismos, plásmidos y condiciones de cultivo.....	13
Extracción y análisis de ácidos nucleicos.....	18
Transformación de cepas bacterianas y levaduras.....	26
Extracción de carotenoides, esteroides y análisis mediante RP-HPLC.....	28
Extracción de proteínas.....	31
Co-inmunoprecipitación (Co-iP).....	31
Western blot.....	32
RESULTADOS.....	34
Identificación y análisis bioinformático del gen <i>DAP1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	34
Construcción de la cepa CBS Δ <i>dap1</i> y análisis de su fenotipo.....	37
Construcción de la cepa CBS Δ <i>sre1</i> Δ <i>dap1</i> y análisis de su fenotipo.....	51
Construcción de cepas con proteínas marcadas con epítopos comerciales mediante la técnica <i>DNA assembler</i>	58
Evaluación de proteínas marcadas en <i>X. dendrorhous</i>	66
Ensayos de interacción proteína-proteína entre Dap1 y las P450s Cyp61 y Cyp51.....	67
DISCUSIÓN.....	74
CONCLUSIONES.....	82
REFERENCIAS.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo.....	15
Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.....	16
Tabla 3. Partidores generados y utilizados en este trabajo.....	20
Tabla 4. Composición de carotenoides de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1 y CBSTr luego de 120 h de cultivo.....	43
Tabla 5. Composición de esteroides de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1 y CBSTr luego de 120 h de cultivo.....	44
Tabla 6. Composición de carotenoides de las cepas CBS 6938 y CBS Δ dap1, luego de 30 h de cultivo suplementado (+ H) o no con hemina.....	50
Tabla 7. Composición de esteroides de las cepas CBS 6938 y CBS Δ dap1, luego de 30 h de cultivo suplementado (+ H) o no con hemina.....	50
Tabla 8. Composición de carotenoides de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1 CBS Δ sre1 Δ dap1 y CBS Δ sre1 luego de 120 h de cultivo.....	56
Tabla 9. Composición de esteroides de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1, CBS Δ sre1 Δ dap1 y CBS Δ sre1 luego de 120 h de cultivo.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta del MVA y rutas de biosíntesis de carotenoides y ergosterol en <i>X. dendrorhous</i>	8
Figura 2. Esquema de los sistemas P450s en <i>X. dendrorhous</i>	11
Figura 3. Estructura del gen <i>DAP1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	34
Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de Dap1.....	36
Figura 5. Construcción del vector pBS- Δ g <i>DAP1-hph</i> y su análisis.....	38
Figura 6. Generación y análisis de la cepa CBS Δ <i>dap1</i>	39
Figura 7. Análisis del fenotipo de color y crecimiento en medios YM-agar suplementados con azoles.....	40
Figura 8. Curvas de crecimiento de las cepas CBS 6938, CBS Δ <i>dap1</i> y CBSTr....	42
Figura 9. Cantidades de carotenoides y esteroides totales de las cepas CBS 6938, CBS Δ <i>dap1</i> y CBSTr.....	42
Figura 10. Nivel de expresión de los genes <i>CYP61</i> , <i>CYP51</i> y <i>crtS</i> evaluado mediante RT-qPCR.....	46
Figura 11. Análisis del fenotipo de color y crecimiento en medios YM-agar suplementados con hemina y/o clotrimazol.....	48
Figura 12. Cantidades de carotenoides y esteroides totales de las cepas CBS 6938 (WT) y CBS Δ <i>dap1</i> , en cultivos suplementados (H) o no con hemina.....	49
Figura 13. Análisis de la cepa CBS Δ <i>sre1</i> Δ <i>dap1</i>	53
Figura 14. Análisis del fenotipo de color y crecimiento en medios YM-agar suplementados con azoles.....	54
Figura 15. Curva de crecimiento y carotenoides y esteroides totales de las cepas CBS 6938, CBS Δ <i>dap1</i> , CBS Δ <i>sre1</i> Δ <i>dap1</i> y CBS Δ <i>sre1</i>	55
Figura 16. Esquema de la técnica <i>DNA assembler</i> empleada en este trabajo.....	59
Figura 17. Amplificación de fragmentos para generar al plásmido <i>v-dap1FLAG-H</i>	61
Figura 18. Análisis mediante PCR del plásmido <i>v-dap1FLAG-H</i>	62
Figura 19. Análisis de clones transformantes de <i>X. dendrorhous</i> para la generación de la cepa CBS Dap1-3xFLAG.....	63
Figura 20. Análisis mediante PCR de las cepas CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA.....	65
Figura 21. SDS-PAGE y western blot de las cepas CBS 6938, CBS Dap1-3xFLAG, CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA...	66
Figura 22. Protocolo empleado para realizar las co-inmunoprecipitaciones (Co-iP).....	69
Figura 23. Co-iP de las proteínas de las cepas CBS 6938, CBS Dap1-3xFLAG y CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA.....	70
Figura 24. Co-iP de proteínas de la cepa CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA utilizando el anticuerpo anti-mouse IgG.....	71

Figura 25. Co-iP de proteínas de las cepas CBS 6938, CBS Dap1-3xFLAG y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA	72
Figura 26. Co-iP de proteínas de la cepa CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA utilizando el anticuerpo anti-mouse IgG1.....	73

ABREVIATURAS

CBR	Citocromo b5 Reductasa
CoA	Coenzima A
Co-iP	Co-inmunoprecipitación
Cyb5	Citocromo b5
CPR	Citocromo P450 Reductasa
Dap1	<i>Damage Response Protein 1</i>
DMAPP	dimetilalil-pirofosfato
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
D.O	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMM	Medio de cultivo mínimo Edinburgh
FAD	flavín adenín dinucleótido
FB	Fracción <i>Bound</i>
FI	Fracción <i>Input</i>
FMN	Flavín mononucleótido
FPP	Farnesil-pirofosfato
FU	Fracción <i>Unbound</i>
GGPP	Geranilgeranil-pirofosfato
INSIG	<i>Insulin-Induced Gene</i>
IPP	Isopentenil-pirofosfato
kb	kilobases
kDa	kilo Dalton
LB	Medio de cultivo <i>Lysogeny Broth</i>
MAPR	Membrane Associated Progesterone Receptor
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OE-PCR	<i>Overlap Extension PCR</i>
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGRMC1	<i>Progesterone Membrane Receptor Component 1</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ppm	Partes por millón (μg carotenoides/g peso seco de levadura)
RE	Retículo endoplásmico
RT	Transcripción reversa
RT-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
SCAP	<i>SREBP Cleavage-Activating Protein</i>
SRE	<i>Sterol-Response Element</i>
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
S1P	<i>Site-1 Protease</i>
S2P	<i>Site-2 Protease</i>
TBS	Buffer Tris salino
TE	Buffer Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
YEP	Medio de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>
YES	Medio de cultivo para <i>S. pombe</i>
YM	Medio de cultivo para <i>X. dendrorhous</i>

RESUMEN

Las enzimas citocromo P450 (P450s) participan en importantes funciones celulares como la biosíntesis de esteroides, entre otros. En *Schizosaccharomyces pombe* se caracterizó la proteína Dap1 (*Damage response protein 1*) como un regulador positivo de P450s y se demostró su participación en la síntesis de ergosterol.

En la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* se han caracterizado tres P450s: Cyp51 y Cyp61, involucradas en la biosíntesis de ergosterol y CrtS, involucrada en la biosíntesis de astaxantina, carotenoide de interés comercial. De esta manera, el objetivo de esta tesis fue identificar y caracterizar el gen *DAP1* de *X. dendrorhous*, junto con estudiar la participación de la proteína Dap1 en vías metabólicas que involucran enzimas citocromos P450. La secuencia génica de *DAP1* se identificó en bases de datos genómicas y transcriptómicas locales de *X. dendrorhous*; *DAP1* corresponde a un gen de 808 pb que codificaría una proteína con un dominio tipo citocromo b5 en su extremo C-terminal y estaría anclada en membrana. La delección de *DAP1* en la levadura afectó la pigmentación y el mutante, denominado *CBSΔdap1*, es sensible a drogas azólicas como clotrimazol, compuesto descrito como inhibidor de la biosíntesis de esteroides. Junto con esto, el mutante *CBSΔdap1* cambió tanto la composición de carotenoides y esteroides, en donde la proporción de astaxantina disminuyó y aumentó la de β-caroteno, sustrato de la P450 CrtS; además, la proporción de ergosterol también disminuyó, acumulándose otros dos esteroides no identificados. Los niveles de transcrito de los genes de las P450s Cyp51, Cyp61 y CrtS, son más altos en el mutante *CBSΔdap1* respecto a la cepa parental, lo cual parece no ser suficiente para mantener los niveles de ergosterol y astaxantina silvestre en la levadura. El aumento en los niveles de transcrito en esta cepa puede ser explicado por una activación de la vía

SREBP, vía involucrada en la mantención de la homeostasis de esteroides en la célula. Para analizar esta posibilidad, se construyó el mutante CBS Δ sre1 Δ dap1. Este mutante es aún más sensible a las drogas azólicas y cambió su pigmentación con respecto a su cepa parental, CBS Δ dap1. La interacción entre Dap1-P450s ha sido observada en levaduras como *S. pombe*, pero imposible de detectar en *S. cerevisiae*, donde se ha propuesto que Dap1 correspondería a una transportadora de hemo. Para evaluar esto, cultivos de la cepa silvestre y CBS Δ dap1 fueron suplementados con hemina (análogo farmacológico de hemo) para analizar la restauración del fenotipo silvestre en cuanto a color, lo cual no fue posible de observar. Interesantemente, la deficiencia del crecimiento en presencia de clotrimazol si fue revertida cuando se adicionaba hemina al medio de cultivo. Al analizar la composición de ergosterol bajo estas condiciones, la proporción de ergosterol no aumentó, pero si se detectaron nuevos esteroides en esta cepa, la cual podría estar mediando la resistencia a la droga. Finalmente, para evaluar la posible interacción entre Dap1 y las P450s Cyp51 y Cyp61 de *X. dendrorhous*, se construyeron cepas con estas proteínas fusionadas a epítomos comerciales. Al realizar ensayos de Co-inmunoprecipitación, se observó que Dap1 es capaz de interactuar de manera proteína-proteína con Cyp61 y Cyp51, siendo esta interacción específica. En conclusión, DAP1 codificaría una proteína con un dominio tipo citocromo b5 conservado que interactúa directamente con las proteínas Cyp51 y Cyp61 y su mutación afecta la composición de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*, sugiriendo que probablemente regula la biosíntesis de esteroides a nivel post-traducciona l de las P450s.

ABSTRACT

Cytochrome P450 (P450s) enzymes are involved in important cellular functions such as the biosynthesis of membrane components, like sterols, among others. In *Schizosaccharomyces pombe*, the Dap1 protein (Damage response protein 1) was characterized as a positive regulator of P450s and its participation in the synthesis of ergosterol was demonstrated.

In the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*, three P450s have been characterized: Cyp51 and Cyp61, involved in the biosynthesis of ergosterol and CrtS, involved in the biosynthesis of astaxanthin, a carotenoid of commercial interest. In this way, the aim of this thesis was to identify and characterize the *DAP1* gene of *X. dendrorhous*, and to study its participation in metabolic pathways that include P450s, such as ergosterol and astaxanthin biosynthesis. The *DAP1* gene sequence was identified in local genomic and transcriptomic databases of *X. dendrorhous*; *DAP1* corresponds to a gene of 808 bp, which would encode a protein that has a cytochrome b5- like domain at its C-terminal end and a transmembrane helix. The deletion of *DAP1* in the yeast, affected its pigmentation and the mutant, named as CBS Δ *dap1*, was sensitive to azole drugs such as clotrimazole, an inhibitor of sterol biosynthesis. Along with this, the composition of carotenoids and sterols changed in the mutant CBS Δ *dap1*, where the proportion of astaxanthin decreased and the one of β -carotene (the substrate of the P450 CrtS) increased. In addition, the proportion of ergosterol decreased, and two unidentified sterols were accumulated. The transcript levels of the P450s encoding genes increased in the mutant CBS Δ *dap1* respect to the parental strain, which seems to be insufficient to keep the ergosterol and astaxanthin wild-type levels in the yeast. The higher P450 transcript levels in this strain can be explained by the activation of the SREBP pathway (involved in the maintenance of sterol homeostasis in the cell) due to

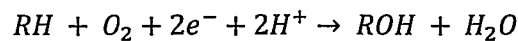
changes of sterol composition. To evaluate this hypothesis, the mutant CBS Δ sre1 Δ dap1 was constructed. This mutant is even more sensible to azole drugs and its pigmentation changed with respect to its parental strain. The interaction between Dap1-P450s has been demonstrated in yeasts such as *S. pombe*, but this interaction has not been detected in *S. cerevisiae*, where it was proposed that Dap1 would correspond to a heme transporter. To evaluate this alternative, cultures of the wild-type strain and CBS Δ dap1 were supplemented with hemin (heme-pharmacological analogous) to analyze if the wild-type color phenotype is restored; however, this was not observed. Interestingly, hemin did increase clotrimazole resistance in CBS Δ dap1. When analyzing the composition of sterols under these conditions, the proportion of ergosterol did not increase, but new sterols were detected in this strain, which could be mediating resistance to the drug. Finally, to evaluate the possible interaction between Dap1 and the P450s Cyp51 and Cyp61, strains containing these proteins fused to commercial epitopes were constructed. Through Co-immunoprecipitation assays, it was observed that Dap1 interacts with Cyp61 and Cyp51, being this interaction specific. In conclusion, *DAP1* would encode a protein with a conserved cytochrome b5-like motif and its mutation affects the composition of carotenoids and sterols in *X. dendrorhous*. In addition, protein-protein interaction between Dap1 with the P450s involved in the sterol biosynthesis was demonstrated suggesting that by this way Dap1 regulates the synthesis of ergosterol at a post-translation level.

INTRODUCCIÓN

Sistemas Citocromo P450

Las enzimas citocromo P450 (P450s) corresponden a una superfamilia de hemo proteínas presentes en todos los dominios de la vida encargadas de catalizar reacciones oxidativas esenciales como lo son la biosíntesis de hormonas esteroideas y componentes estructurales de la membrana celular, activación y detoxificación de drogas y de agentes químicos contaminantes, síntesis de metabolitos secundarios en plantas e insectos, entre otros (Estabrook., 2003).

Estas enzimas llevan a cabo su función mediante la inserción de un átomo de oxígeno proveniente del oxígeno molecular O_2 en un sustrato orgánico (RH), mientras el segundo oxígeno es reducido a agua consumiendo dos equivalentes reductores para la formación de ROH como se indica a continuación:



En la reacción, los protones se envían al centro catalítico de la P450 a través de las cadenas laterales de aminoácidos del sitio activo, siendo esto crítico para la división del enlace O-O (McLean y col., 2005). Para llevar a cabo su acción catalítica, las enzimas P450s necesitan un donador de electrones. De acuerdo con el tipo de proteína que realiza esta acción, los sistemas P450s se pueden clasificar en 10 clases. Los sistemas más comunes en las células eucariontes son los de clase II, los cuales se encuentran anclados en la membrana del retículo endoplásmico (RE). En este caso, los electrones necesarios para la actividad de la P450 provienen principalmente de NADPH, los cuales son transferidos por una enzima Citocromo P450 Reductasa (CPR)

(Córdova y col., 2017). De esta manera, los electrones fluyen desde el NADPH al grupo prostético FAD, luego FMN (ambos presentes en la CPR) para finalmente llegar al grupo hemo de la P450 (McLean y col., 2005). Dado que la proteína CPR se encuentra en la membrana del RE en cantidades subestequiométricas en comparación con las P450s presentes en este organelo, se ha propuesto que la interacción entre estas proteínas involucra complejos oligoméricos transitorios (Ryu y col., 2017).

Otra proteína capaz de interactuar con las P450s en el RE es la hemoproteína citocromo b5 (CYB5). Esta proteína se encuentra acompañada de la enzima citocromo b5 Reductasa (CBR), la cual es capaz de entregar electrones a la P450s a partir del NADH (Črešnar y Petrič., 2011), constituyendo un sistema alternativo donador de electrones. Por un largo tiempo, CPR y CYB5 fueron las únicas proteínas conocidas capaces de interactuar funcionalmente con P450s para llevar a cabo su actividad monooxigenasa en el retículo. Recientemente, se han descrito nuevos candidatos de interacción proteína-proteína con las P450s, encontrando entre ellas a un miembro de la familia MAPR, la proteína PGRMC1.

PGRMC1 (*Progesterone Membrane Receptor Component 1*) o Dap1 (*Damage response protein 1*)

La proteína PGRMC1 (*Progesterone Membrane Receptor Component 1*) pertenece a la familia de las MAPR (*Membrane Associated Progesterone Receptor*), la cual consiste en un grupo de proteínas que comparten un dominio citocromo b5 en su estructura (Ryu y col., 2017). En mamíferos, se han identificado 4 proteínas de este tipo: Neudesina, Neuferricina, PGRMC2 y PGRMC1.

PGRMC1 se ha caracterizado como una proteína pequeña, de aproximadamente 25 kDa, con un segmento transmembrana en su extremo N-terminal

y un dominio citocromo b5 en el C-terminal. Se ha determinado que esta proteína en mamíferos co-localiza con las P450s en el RE, pero también se ha identificado que puede encontrarse en el núcleo, citoplasma o mitocondria (Piel y col., 2016).

PGRMC1 se identificó por primera vez como un miembro de un complejo multiproteico que une progesterona, aunque no es capaz de unirse a ella directamente, siendo la única función bioquímica conocida de PGRMC1 su capacidad de unir hemo gracias a su dominio citocromo b5 (Rohe y col., 2009). En mamíferos, esta proteína está presente predominantemente en el hígado y en el riñón, pero también se ha observado un nivel bajo de ella en los tejidos esteroideogénicos y reproductivos, el cerebro, la mama, el corazón, los pulmones, el músculo esquelético, el páncreas y otros órganos (Kimura y col., 2012). Entre las funciones fisiológicas identificadas en mamíferos para esta proteína, se ha observado que participa en la síntesis y metabolismo de esteroides, regulación del colesterol y en la proliferación celular (Kimura y col., 2012).

La evidencia que sugiere que la proteína PGRMC1 puede interactuar con sistemas de P450s microsómicos para modular su función, se basa en evidencia recogida de diferentes especies, incluyendo levaduras y líneas celulares humanas, utilizando P450s implicadas en catalizar reacciones relacionadas con la síntesis de esteroides o compuestos xenobióticos. El tipo de interacción observado va desde interacción proteína-proteína, a una influencia indirecta con la transferencia de hemo a la proteína (Ryu y col., 2017).

Una evidencia de interacción proteína-proteína entre PGRMC1 y P450s es la identificada en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. En este organismo se han identificado solo dos P450s, Cyp51 y Cyp61, las cuales se encuentran involucradas en la biosíntesis de ergosterol el cual corresponde al principal esteroide

presente en hongos, siendo el análogo al colesterol presente en las células de mamíferos. La enzima Cyp51 o lanosterol 14 α -demetilasa, como su nombre lo indica, cataliza la demetilación de lanosterol en levaduras, acción que es llevada a cabo en tres pasos, con la generación de un intermediario en el proceso. Dada su importancia en la biosíntesis de esteroides, esta enzima ha sido utilizada como blanco para la búsqueda de drogas antifúngicas, como lo son los azoles fluconazol, ketoconazol o clotrimazol (Črešnar y Petrič., 2011). La enzima Cyp61 o C-22 esterol desaturasa es una enzima exclusiva de hongos, la cual se encarga de introducir un doble enlace en la cadena lateral de un intermediario en la biosíntesis de ergosterol. En *S. pombe*, se identificó un homólogo a PGRMC1, denominado Dap1 (*Damage response protein 1*), el cual es capaz de interactuar establemente con las dos P450s presentes en esta levadura, interacción identificada mediante co-inmunoprecipitación (Hughes y col., 2007). En este mismo estudio, se demostró además que PGRMC1 de humanos es capaz de unirse establemente con Cyp51 humana y con otras P450s como Cyp3A4, involucrada en metabolizar compuestos farmacéuticos. Las observaciones anteriores sugieren que la proteína PGRMC1/Dap1, posee un rol general en la modulación de P450s (Hughes y col., 2007).

Así mismo, se ha identificado un homólogo a PGRMC1, Dap1, en otras levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*. En este microorganismo, se observó que la ausencia de esta proteína hace a las cepas sensibles a daño en el DNA, ya que fallan los procesos de reparación de éste (Rohe., 2009). El fenotipo observado puede ser revertido en el mutante de delección $\Delta dap1$ si se adiciona hemo de manera exógena. Además, la delección del gen *DAP1* afectó la síntesis de ergosterol, alterando la función de la enzima Cyp51 en este organismo (Mallory y col., 2005). Así mismo, se demostró que su ausencia afecta la funcionalidad de la enzima P450 Cyp61, acumulándose

intermediarios de la síntesis de ergosterol, fenotipo que también revierte con la adición exógena de hemo. De acuerdo con los resultados obtenidos por este grupo, la unión de hemo por Dap1 es requerida para la activación de Cyp51, a pesar que la interacción Dap1-Cyp51 no pudo ser detectada en experimentos de co-inmunoprecipitación (Mallory y col., 2005).

Recientemente, en el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* se han identificado tres homólogos de Dap1 que se denominaron DapA, DapB y DapC. La expresión de los genes que codifican estas proteínas se ve inducida ante la presencia de azoles, siendo DapA clave para la estabilización de las P450s Cyp51 y Cyp61. En el modelo presentado por estos investigadores, indican que DapA estaría implicado en la transferencia de hemo a las P450s de esta levadura, estabilizando el complejo P450-hemo, mientras DapB y DapC cumplirían un rol opuesto al competir por hemo, desestabilizando a las P450s (Song y col., 2016).

Kabe y col., 2016, investigaron la importancia de la dimerización de PGRMC1 producida por la unión del grupo hemo para la unión de P450s en humanos. A diferencia de la proteína Cyb5, que es capaz de unir el hierro de hemo de manera hexa-coordinada a través de dos residuos de histidina axiales, en PGRMC1 estas histidinas se encuentran ausentes, y el hierro de hemo se encuentra penta-coordinado con un residuo de tirosina. Al reemplazar esta tirosina por fenilalanina, no se obtuvo co-inmunoprecipitación y, por tanto, no hubo unión con P450s, no así cuando se realizó el mismo experimento con la copia silvestre de PGRMC1. Ellos postularon que, en humanos, la proteína PGRMC1 se encuentra en un estado inactivo como monómero. Cuando se une a hemo, PGRMC1 forma un dímero que le permite interactuar con proteínas como P450s (Kabe y col., 2016).

Piel y col., 2016, demostraron la capacidad de PGRMC1 de transferir hemo a

CYB5 *in vitro*, y la importancia de esta proteína en la homeostasis de este grupo prostético. De acuerdo con sus resultados, el grupo de trabajo sugiere que PGRMC1 podría estar funcionando como un transportador de hemo (proteína tipo chaperona) o cumplir una función de "sensor" de este compuesto, lo que podría estar relacionado directa o indirectamente con la actividad de las P450s.

Como se mencionó, se ha demostrado la activación de la enzima Cyp51 por PGRMC1 (o Dap1 en levaduras) en distintos organismos, indicando la importancia de esta proteína en la síntesis de colesterol o ergosterol. Ahora bien, la activación de Cyp51 por PGRMC1 no es la única relación que tiene esta proteína con esta vía metabólica. Se ha observado que PGRMC1 es capaz de unirse a las proteínas INSIG (*Insulin-Induced Gene*) y SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*), proteínas implicadas en la vía SREBP (Bien y Espenshade., 2010).

Vía SREBP

La vía SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) es el principal sistema de regulación de la homeostasis del colesterol. Esta vía en mamíferos (revisada en Bien y Espenshade, 2010) se encuentra conformada por el factor transcripcional SREBP que se sintetiza como un precursor inactivo anclado a la membrana del RE. Si los niveles de esteroides son suficientes, la proteína SCAP une esteroides y retiene a SREBP en la membrana del RE gracias a la interacción de SCAP con la proteína INSIG. Si los niveles de esteroides disminuyen, SCAP cambia su conformación, lo que interrumpe su interacción con INSIG permitiendo la movilización del complejo SCAP-SREBP hacia el Aparato de Golgi, donde SREBP es sucesivamente cortado por las proteasas S1P y S2P (*Site-1 Protease* y *Site-2 Protease*). De esta manera, se libera el dominio N-terminal de SREBP (SREBPN, proteína activa) que se traslada al núcleo y

cumple su función como factor transcripcional. En el núcleo, SREBPN reconoce y se une a secuencias SRE (*Sterol Regulatory Element*) en la región promotora de genes blanco, promoviendo así la transcripción de genes relacionados con la síntesis de colesterol (Bien y Espenshade, 2010). La función biológica de la unión de PGRMC1 a proteínas de la vía SREBP aún es un tema de estudio, aunque se conoce que en la levadura *S. pombe*, la activación transcripcional del homólogo de PGRMC1 (gen *DAP1*), es blanco de SREBP ante la deficiencia de ergosterol, así como también las P450s involucradas en este paso.

Xanthophyllomyces dendrorhous

X. dendrorhous es una levadura carotenogénica capaz de producir el pigmento astaxantina, un carotenoide de gran importancia en la industria salmonera de nuestro país, ya que es el encargado de otorgar la coloración característica a los salmónidos. La capacidad de *X. dendrorhous* de sintetizar astaxantina, la hace atractiva desde un punto de vista biotecnológico, ya que fuentes naturales de este carotenoide son escasas (Rodríguez-Sáiz y col., 2010). En esta levadura, se han identificado bioinformáticamente trece genes de P450s (Córdova y col., 2017), de las cuales tres han sido caracterizadas funcionalmente: dos de ellas están implicadas en la biosíntesis de ergosterol: Cyp51 y Cyp61, y la tercera, en la biosíntesis de astaxantina: CrtS (Astaxantina Sintasa). En particular, esta última cataliza el último paso de producción de astaxantina a partir de β -caroteno. La vía de síntesis de astaxantina y ergosterol se encuentran relacionadas, ya que ambos metabolitos corresponden a compuestos isoprenoides derivados de la ruta del mevalonato (MVA). La ruta del mevalonato, junto con las rutas de biosíntesis de carotenoides y esteroides se muestran en la Figura 1.

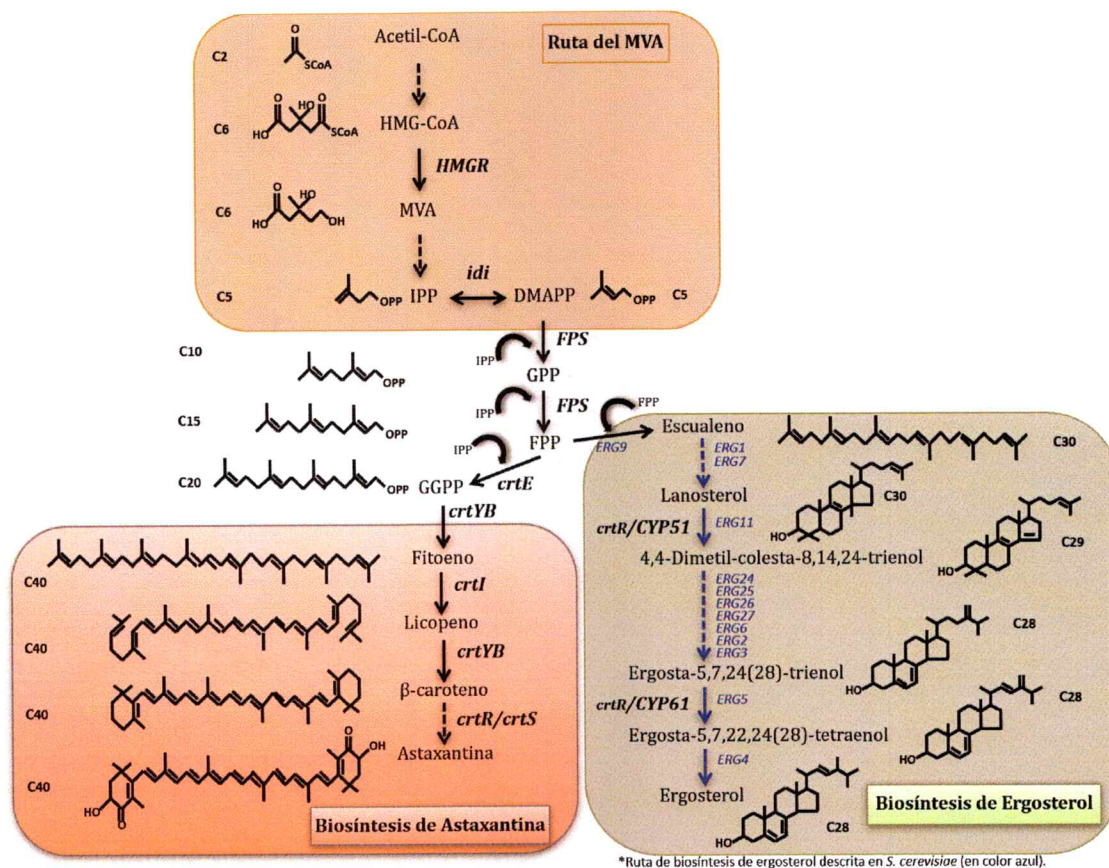


Figura 1. Ruta del MVA y rutas de biosíntesis de carotenoides y ergosterol en *X. dendrorhous*. Las flechas representan las etapas catalíticas con el respectivo gen que codifica a la enzima involucrada (flechas discontinuas representan más de un paso catalítico implicado y en color azul la ruta descrita en *S. cerevisiae*) (Tomado de Gómez, 2017).

En *X. dendrorhous*, la vía del mevalonato se inicia con acetil-CoA, el cual luego de sucesivas reacciones químicas da a lugar a isopentenil pirofosfato (IPP, C₅) siendo éste la unidad básica estructural de los componentes posteriores en la vía. Luego, IPP es unido a su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP, C₅) formando geranil pirofosfato (GPP, C₁₀), al cual se le adiciona otra molécula de IPP formándose farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅). El FPP es el precursor de la síntesis de esteroides (con la condensación de dos moléculas de FPP para formar escualeno, C₃₀), pero, por otro lado, la adición de

una molécula de IPP a FPP genera geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, C₂₀) que es precursor de los carotenoides (Loto y col., 2012).

La ruta de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* se inicia cuando dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) se condensan para formar fitoeno, el primer carotenoide en esta vía de síntesis. Luego de sucesivas reacciones químicas, se forma el β -caroteno, el cual es sustrato de la enzima P450, astaxantina sintasa (CrtS). Para llevar a cabo esta acción, CrtS utiliza de manera exclusiva al donador de electrones CrtR (Alcaíno y col., 2008), enzima citocromo P450 reductasa que transfiere electrones desde NADPH.

La ruta de biosíntesis de esteroides en *X. dendrorhous* comienza con la condensación de dos moléculas de FPP por la enzima escualeno sintasa para formar el escualeno. Esta molécula, en pasos posteriores forma el compuesto lanosterol, el sustrato de la enzima Cyp51 para la formación del 4,4-dimetil-colesta-8, 14, 24-trienol. Esto compuesto luego de sucesivas reacciones químicas forma el compuesto ergosta-5, 7, 24(28)-trienol, el cual es el sustrato de la P450 Cyp61 para la formación de ergosta-5, 7, 22, 24(28)-tetraenol, el cual con posterioridad forma el compuesto final, ergosterol. Ambas enzimas utilizan preferentemente como donador de electrones a CrtR, pero dado que la biosíntesis de esteroides es esencial para la célula, estas enzimas pueden utilizar como donador alternativo de electrones, al sistema CYB5-CBR (Gutiérrez y col., 2015), obteniendo electrones a partir del NADH.

Se ha observado que interrumpir la vía de síntesis de ergosterol mediante la mutación del gen *CYP61*, que controla uno de los últimos pasos de la vía, produce un aumento en la síntesis de astaxantina, observándose una coloración más rojiza en los mutantes (Loto y col., 2012) sugiriendo un rol regulador de los esteroides sobre la carotenogénesis. Como se mencionó anteriormente, la principal vía que regula la

homeostasis de esteroides es la vía SREBP, y se postula que la activación de esta vía en la cepa que no posee una Cyp61 funcional, explicaría el fenotipo sobreproductor de carotenoides en estos mutantes. A la fecha, se han identificados dos genes homólogos a los descritos en la vía SREBP en *X. dendrorhous*: *SREBP*, denominado *SRE1*, el cual codificaría al factor transcripcional cuya funcionalidad y caracterización se encuentra en estudio en la tesis doctoral de Gutiérrez (en progreso) y *S2P* o *STP1*, que codifica a la proteasa que realiza el corte para la liberación del dominio N-terminal de Sre1 (Sre1N, factor transcripcional activo) (Gómez, 2017).

En *X. dendrorhous*, la delección del gen *SRE1* en las cepas parental y $\Delta cyp61$ (cepa que probablemente posee la vía SREBP activa), resulta en la disminución de los niveles de transcrito de las P450 *crtS* y *CYP51*, y del donador de electrones *crtR*, lo que podría indicar que Sre1 estaría regulando la transcripción de estos genes. Por el contrario, se observó que los niveles de transcrito del posible gen identificado como *DAP1* se encuentran aumentados en las mismas cepas (González., 2016). Se propuso que el aumento de los niveles de transcrito podría deberse a que, dada la disminución de las P450s en la levadura, Dap1 podría aumentar su expresión para estabilizar y aumentar su actividad de las restantes.

En resumen, en *X. dendrorhous* se han identificado y caracterizado tres P450: Cyp51 y Cyp61, ambas involucradas en la biosíntesis de esteroides, y una involucrada en la biosíntesis de carotenoides, CrtS. Además, se ha identificado como donador de electrones principal de P450s a CrtR, y como donador secundario, el sistema conformado por las proteínas CYB5/CBR (Figura 2). En esta tesis se pretende identificar y caracterizar el gen *DAP1* (como se ha denominado en hongos y levaduras), y estudiar el efecto de su delección, lo cual se espera que afecte la composición de carotenoides y esteroides por su interacción con las P450s identificadas y caracterizadas

en la levadura. Además, se pretende evaluar si ocurre interacción proteína-proteína entre Dap1 y las P450, o si el posible traspaso de hemo dado por las P450s es suficiente para revertir el fenotipo observado, con lo cual se utilizará el análogo hemina.

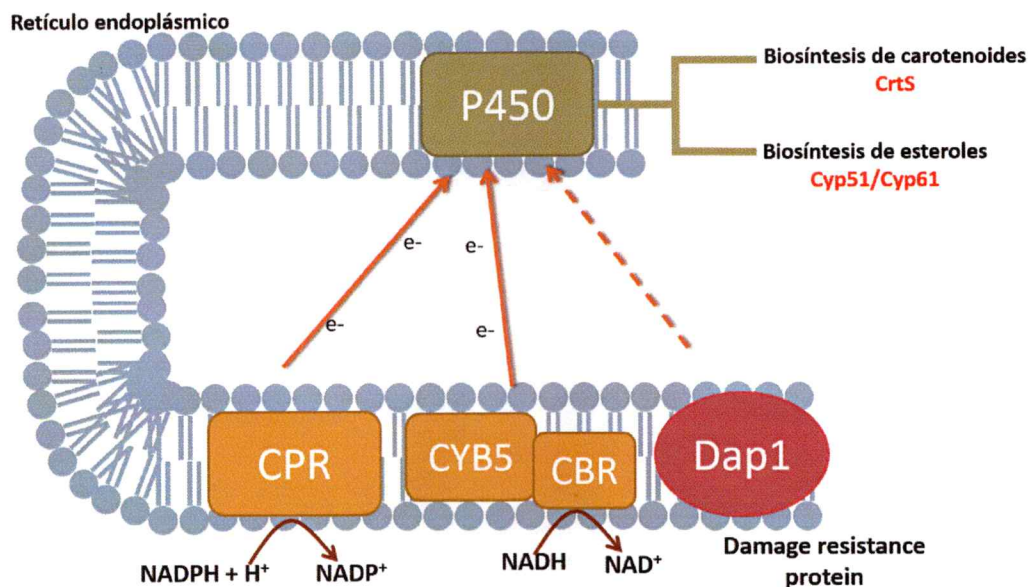


Figura 2. Esquema de los sistemas P450s en *X. dendrorhous*. En la figura se indican las P450 identificadas y caracterizadas en *X. dendrorhous* (Cyp51, Cyp61 y CrtS), junto con los donadores de electrones CPR (Citocromo P450 Reductasa, CrtR) y el sistema conformado por CYB5/CBR (Citocromo B5/Citocromo b5 Reductasa). Se muestra en líneas punteadas la posible interacción entre Dap1/P450s, la cual se pretende estudiar en este trabajo.

Hipótesis

La proteína Dap1 de *Xanthophyllomyces dendrorhous* regula la función de las enzimas citocromos P450 involucradas en la biosíntesis de ergosterol y astaxantina.

Objetivo General

Estudiar la participación del gen *DAP1* de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* en vías metabólicas que involucran enzimas citocromos P450 como la

biosíntesis de ergosterol y de astaxantina.

Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar el gen *DAP1* de *X. dendrorhous*.
2. Estudiar la funcionalidad de *DAP1* de *X. dendrorhous* a través de la construcción de un mutante $\Delta dap1$ y análisis de su fenotipo.
3. Evaluar la interacción de Dap1 de *X. dendrorhous* con proteínas P450s y analizar el requerimiento de hemina en el mutante $\Delta dap1$ para revertir el fenotipo observado.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas de microorganismos utilizadas en esta tesis se detallan en la Tabla 1 y los plásmidos, en la Tabla 2. En los casos de cultivos en medios semi sólidos (medio-agar), se utilizó 1,5% de Bacto-agar.

1.1 Bacterias

Para los experimentos de clonado se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* (Hanahan., 1985) la cual fue cultivada en medio LB (*Lysogeny Broth*: Triptona 1%, Extracto de levadura 0,5% y NaCl 0,5%) con agitación constante a 37°C. Los medios de cultivo líquido se suplementaron con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron con agitación constante para la extracción de DNA plasmídico. Para la selección de colonias transformantes y recombinantes, se utilizó medio LB-agar suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) y X-gal (20 mg/ml).

1.2 Levaduras

1.2.1 *S. cerevisiae*

Para ensamblar los fragmentos de DNA necesarios para la generación de un vector mediante la técnica *DNA assembler* (Oldenburg y col., 1997; Gibson., 2009; Shao., 2009 y Joska y col., 2014), se utilizó la cepa S288c de *S. cerevisiae* (ATCC® 204508™) la cual se cultivó en medio YEP (Extracto de levadura 1%, Glucosa 2%, Peptona 2%), con agitación constante a 30°C. Para la selección de transformantes, se utilizó medio YEP-agar suplementado con el antibiótico G-418 (200 μ g/ml).

1.2.2 *S. pombe*

Como control en los ensayos de *Western blot* se utilizó la cepa PEY901 de *S. pombe* (Hughes y col., 2007), en la cual se reemplazó el gen *DAP1* por un módulo que otorga resistencia al antibiótico G-418. Esta cepa fue transformada con un vector que posee la secuencia que codifica a la proteína Dap1 de *S. pombe* fusionada con el epítipo HA. Para llevar a cabo los experimentos de transformación, esta cepa se cultivó en medio EMM (*Edinburgh minimal medium*) (Ftalato ácido de potasio 0,3%, Fosfato de sodio dibásico 0,22%, Cloruro de amonio 0,5%, Glucosa 2%, Stock de sal 1X, Stock de vitaminas 1X y Stock de minerales 1X) el cual se suplementó con 225 mg/ml de lisina, histidina, leucina, adenina y uracilo junto con el antibiótico G-418 (200 µg/ml). Para la selección de transformante se utilizó medio EMM-agar sin suplementar el requerimiento uracilo.

Para replicar y refrescar la cepa, ésta se cultivó en medio YES-agar (Extracto de levadura 5 g/L, Glucosa 30 g/L y 225 mg/ml de los suplementos lisina, histidina, leucina, adenina y uracilo). La cepa se cultivó con agitación constante a 30°C.

1.2.3 *X. dendrorhous*

Las cepas de *X. dendrorhous* silvestre (CBS 6938) y mutantes (Tabla 1) fueron cultivadas en medio YM (Extracto de levadura 0,3%, Extracto de malta 0,3%, Peptona 0,5% y Glucosa 1%) con agitación constante a 22°C. Para la selección de colonias transformantes, se utilizó medio YM-agar suplementado con higromicina B (35 µg/ml) y/o zeocina (45 µg/ml) según el genotipo de la cepa.

Para la realización de las curvas de crecimiento descritas en este trabajo, cada cepa se cultivó por triplicado a 22°C en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio YM. Luego de 30 o 120 h, dependiendo del caso, se colectó muestras para la

extracción de carotenoides, esteroides, RNA y peso seco.

Tabla 1. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Cepa de <i>E. coli</i> sensible a ampicilina	Hanahan., 1985
<i>S. cerevisiae</i>		
S288c	Cepa parental de <i>S. cerevisiae</i> de genotipo <i>MATα SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6.</i>	ATCC 204508
<i>S. pombe</i>		
PEY901	Cepa de <i>S. pombe</i> que deriva de la cepa silvestre KGY425 la cual posee un reemplazo del gen <i>dap1</i> por un módulo que otorga resistencia a kanamicina.	Hughes y col., 2007
PEY901- dap1	3xHA- Cepa de <i>S. pombe</i> PEY901 la cual posee el vector pJE602 para expresar la proteína Dap1 fusionada al epítipo HA.	Hughes y col., 2007
<i>X. dendrorhous</i>		
CBS 6938	Cepa silvestre de <i>X. dendrorhous</i>	ATCC 96594
CBSTr	Cepa que deriva de CBS 6938 la cual posee un reemplazo del gen <i>crtR</i> por un módulo que otorga resistencia a higromicina.	Alcaino y col., 2008
CBS Δ <i>dap1</i>	Cepa que deriva de CBS 6938 la cual posee un reemplazo del gen <i>DAP1</i> por un módulo que otorga resistencia a higromicina	Este trabajo
CBS Δ <i>sre1</i>	Cepa que deriva de CBS 6938 la cual posee una delección parcial del gen <i>SRE1</i> , el cual fue reemplazado por un módulo de resistencia a zeocina.	Gutiérrez, Tesis de Doctorado en progreso
CBS Δ <i>sre1</i> Δ <i>dap1</i>	Cepa que deriva de CBS Δ <i>sre1</i> en la cual el gen <i>DAP1</i> fue reemplazado por un módulo de resistencia a higromicina.	Este trabajo

CBS Dap1-3xFLAG	Cepa que deriva de CBS 6938 en la que fue reemplazado el gen <i>DAP1</i> por el mismo gen fusionado con tres copias de la secuencia que codifica al epítipo FLAG más un módulo que otorga resistencia a higromicina.	Este trabajo
CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA	Cepa que deriva de CBS Dap1-3xFLAG en la que fue reemplazado el gen <i>CYP61</i> por el mismo gen fusionado con tres copias de la secuencia que codifica al epítipo HA más un módulo que otorga resistencia al antibiótico Zeocina	Este trabajo
CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA	Cepa que deriva de CBS Dap1-3xFLAG en la que fue reemplazado el gen <i>CYP51</i> por el mismo gen fusionado con tres copias de la secuencia que codifica al epítipo HA más un módulo que otorga resistencia al antibiótico Zeocina	Este trabajo

1.3 Plásmidos

Los plásmidos utilizados y generados en este trabajo se encuentran detallados en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pBlueScript SK-(pBS)	Vector utilizado para clonado en <i>E. coli</i> , el cual posee un módulo de resistencia a Ampicilina y el gen de la enzima β -galactosidasa con MCS (Multiple Cloning Site). Posee el origen de replicación ColE1.	Stratagene
pBS- Δ g <i>DAP1</i> -hph	Plásmido pBS portador del módulo de delección de <i>DAP1</i> . Comprende el módulo de resistencia a higromicina flanqueado por una región río arriba y río abajo del gen <i>DAP1</i> .	Este trabajo
v-dap1FLAG-H	Plásmido generado utilizando la técnica <i>DNA assembler</i> . Posee el origen de replicación y resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2 μ , la secuencia genómica de <i>DAP1</i> fusionada con 3xFLAG, terminador del mismo gen, módulo de resistencia a higromicina, una región río abajo del gen <i>DAP1</i> (zona <i>DOWN</i>) y un módulo de resistencia a Kanamicina.	Este trabajo

v-CYP61HA-Z	Plásmido generado utilizando la técnica <i>DNA assembler</i> . Posee el origen de replicación y resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2 μ , la secuencia genómica de <i>CYP61</i> fusionada con 3xHA, terminador del mismo gen, módulo de resistencia a zeocina, una región río abajo de <i>CYP61</i> (zona <i>DOWN</i>) y un módulo de resistencia a Kanamicina.	Este trabajo
v-CYP51HA-Z	Plásmido generado utilizando la técnica <i>DNA assembler</i> . Posee el origen de replicación y resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2 μ , la secuencia genómica de <i>CYP51</i> fusionada con 3xHA, terminador del mismo gen, módulo de resistencia a zeocina, una región río abajo de <i>CYP51</i> (zona <i>DOWN</i>) y un módulo de resistencia a Kanamicina.	Este trabajo

1.4 Crecimiento de cepas en medios suplementados con azoles mediante microgotas y ensayos con hemina

Para evaluar el efecto de compuestos azólicos (clotrimazol, ketoconazol e itraconazol), se cultivaron cepas de *X. dendrorhous* por dos días en medio YM a 22°C con agitación constante para la realización de diluciones seriadas y luego sembrar microgotas. Para ello, el medio YM-agar se suplementó con 0,1 μ g/ml de clotrimazol, 0,1 μ g/ml de ketoconazol o 30 mM de itraconazol, sobre el cual se depositó 5 μ l de cada dilución de las diferentes cepas.

Para evaluar el efecto de hemina sobre la cepa CBS Δ dap1, se realizó microgotas de esta cepa y de la cepa parental (CBS 6938) para evaluar el fenotipo de color observado en la cepa CBS Δ dap1. Para ello, se sembró microgotas de las cepas en estudio en medio YM-agar suplementado con diferentes concentraciones de hemina (13, 30 y 60 μ g/ml). Para evaluar cualitativamente el efecto de la hemina sobre la biosíntesis de esteroides, se utilizó placas YM-agar suplementadas con hemina (13

µg/ml) y/o clotrimazol (0,1 µg/ml), realizando el mismo procedimiento recientemente descrito.

Para evaluar la composición de esteroides y carotenoides en las cepas CBS 6938 y CBS Δ dap1 al suplementar cultivos con hemina, se realizó una curva de crecimiento de 30 h, en los cuales se utilizó medio YM suplementado con hemina (13 µg/ml).

2. Extracción y análisis de ácidos nucleicos

2.1 Extracción de DNA plasmídico desde *E. coli*

La extracción de DNA plasmídico desde *E. coli* se realizó con el kit Gene JET Plasmid Miniprep Kit (ThermoScientific) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El DNA plasmídico obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.2 Extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae* y *X. dendrorhous*

La extracción de DNA genómico de levaduras se realizó mediante ruptura mecánica con perlas de vidrio (Sambrook y Russell., 2001). Para ello, se colectó el sedimento celular proveniente de un cultivo en medio semi-sólido, el cual se suspendió en 300 µl de buffer TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8) y 100 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Posteriormente, a cada muestra se le adicionó 400 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción 25: 24: 1, el cual se homogenizó en vórtex por 6 min y luego se centrifugó a 10.000 x g por 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se le adicionó 400 µl de cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción 24: 1, se homogenizó nuevamente en vórtex por 6 min y se centrifugó a 10.000 x g por 5 min, recuperando nuevamente la fase acuosa. El lavado con cloroformo: alcohol isoamílico se realizó dos veces. Luego, a la fase acuosa recuperada se le agregó dos volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) para la precipitación de DNA, incubando a -

20°C cada muestra por al menos 1 h. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 10.000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el DNA se lavó con un volumen de etanol al 70%. Finalmente, una vez que el sedimento se encontraba seco, se agregó entre 10-100 µl de agua estéril, se centrifugó por 10 s y el sobrenadante con el DNA se depositó en un tubo Eppendorf nuevo. El rendimiento de la extracción se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

2.3 Extracción de RNA de *X. dendrorhous*

La extracción de RNA se realizó a partir de un sedimento celular de 2 ml proveniente de un cultivo en fase estacionaria (120 h de cultivo, aproximadamente). El sedimento celular obtenido se suspendió en 200 µl de buffer de lisis (acetato de Na⁺ 0,002 M pH 5,5, SDS 0,5%, EDTA 1 mM, en agua DEPC 0,1%), al cual se le adicionó 100 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Cada muestra se homogenizó en vórtex por 5 min a 4°C, a la cual posteriormente se le adicionó 800 µl de TriReagent (Life Technologies). Nuevamente, cada muestra se homogenizó en vórtex por 5 min a 4°C, para posteriormente incubar a temperatura ambiente por 10 min. A continuación, se agregó 200 µl de cloroformo, se agitó manualmente por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 6 min. Se centrifugó a 14.000 x g por 15 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Esta última se depositó en dos tubos Eppendorf y a cada uno se le agregó 250 µl de agua estéril y 550 µl de isopropanol frío, y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Luego, se centrifugó por 15 min a 14.000 x g a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se lavó el sedimento con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente por 5 min. El sedimento se dejó secar y se suspendió en 20 a 30 µl de agua estéril.

2.4 Digestión de DNA plasmídico y reacción de ligado

Las reacciones de digestión y de ligado, se realizaron en un volumen de 20 μ L siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor de las enzimas (ThermoScientific). La reacción de ligado entre el DNA plasmídico digerido y el DNA inserto se realizó con la enzima DNA ligasa T4 con una relación inserto: vector de 5: 1. Cada reacción de ligado se dializó por 10 min, y se utilizó 4 μ L para la transformación de *E. coli* mediante electroporación.

2.5 PCR, RT-PCR y qPCR

Todos los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Partidores generados y utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Orientación
Gen <i>DAP1</i> y regiones flanqueantes		
CTR_F	TGGCCTACTCGATCGTATTTTC	D
CTR_R	GACATTTTCAGAAGGCCTGAGG	R
DAP1_ATG.F	ATGTCACTCTCGATCCTTGTC	D
DAP1_STOPR2.R	TCATGAATCGGTGTTCTCTAT	R
DAP1_int_DOWN_R	GCGGGTATACGATCAGCTTTA	R
Gen <i>SRE1</i> y regiones flanqueantes		
Sre1.1_F	ATGGAAGACCTGTTCGAAG	D
Sre1.1_R	ATGGAAGACCTGTTCGAAG	R
Sre1_Med.F	AATCACCCCTCCCGCTCGATACAC	D
Sre1_Med.R	GCTCCC.TTTGAAGTTCGAGGATGT	R
3Up.F	CGTTTGAAGGGACGGAAGGA	D
Sre_Del2_Out.R	TGTGACAGACGAGACCAAGAACAG	R
Gen <i>CYP61</i> y regiones flanqueantes		
CYP61.F	CTGAGCCCTGTCTTGTTGCC	D
CYP61Ff.Fw	TCGAGTACGCCTACATGCAC	D
Cyp61-cf2.Rv	CGATCTCCGCGATATAGGAT	R
Cyp61dw.Rv	GTAAGTGGAGCGAGCCAAAG	R
CYP61_int_UP.F	TCGTTACCTAAGAGACGAG	D
CYP61_int_DOWN_R	AACCGATCGAAGAAGATGCAC	R

Gen CYP51 y regiones flanqueantes

CYP51.F	CAAGGATGTCGTATACGATTGC	D
CYP51.R	GAGGTGTGCTGACCGGCC	R
CYP51.Re.R	CTTCCTGCAGACAAGACACG	R
CYP51Ff.Fw	CGGGAGAGCAGTACGAGAAC	D
cCYP51.R	TCGCCCAAATTTGAAGAGAC	R
CYP51_int_UP.F	TGACACGTAGCAGGATTCTTG	D
CYP51_int_DOWN.R	CGAACAGTATCCTGACAGGC	R

Módulo de higromicina y zeocina

P.Tef.F	ATCGGCTCATCAGCCGACAGT	D
T.gpd.R	ATGAGAGATGACGGAGATGAT	R
H-out.R	TCCATCACAGTTTGC	R
H-out2.F	CTCGCCGATAGTGGAACCGAC	D
Zeo_int_F	GAGTGGTCGGAGGTCGTGTC	D
Zeo_int_R	CGTGACCCTGTTCATCAGC	R

Construcción de cepa CBS Δ dap1

gDel_DAP1.F	CGACCGTAGGAAAGAAAGAGA	D
gDel_DAP1.R	CCTTTCCGATCTGTACTCTCA	R
gDel_DAP1_HpaI.F	ACCACCCTGACGTTAACACTACTTTTAGCT CTCCTTTC	D
gDel_DAP1_HpaI.R	CTAAAAGTAGTGTTAACGTCAGGGTGGTGA ACGGATT	R
Pre_del_DAP1.F	TTAGAGGCGAGGTCTTTGTTC	D
Pre_del_DAP1.R	TCTTCCTTCTCTACTGACCTG	R

Partidores DNA assembler**Partidores comunes para la construcción de las cepas**

A.Fw	TATCATGCGTCAATCGTATGTGATGCTGGTC GCTATACTGGCATTAAAGCGCGGCGGGTG	D
A.Rv	AGTCCGTGGAATTAATTCTCATCTTTGACAG CTTATCATCGATAAGTGCGCGGAACCCCT	R
H.Rv	GCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCC GCCGCGCTTAATGCCAGTATAGCGACCAGC	R

Partidores para generación de v-dap1FLAG-H

up.Fw	TTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTCCG CAATGGTTAACCGGTGCTTGCATAAGGCA	D
dap1FLAG.Rv	ATATCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTC TTTGTAGTCTGAATCGGTGTTCTCTATC	R
FLAG.Fw	GTATATCATCTGTGGGTCATTGATAGAGAAC ACCGATTACAGACTACAAAGACCATGACGG	D
FLAG.Rv	GACGAGAAAACAAATACCTTGCTGATCGAAA GGAGAGCTCATTTATCGTCGTCATCTTTG	R
Tdap1.Fw	AAGATCATGATATCGACTACAAAGATGACGA CGATAAATGAGCTCTCCTTTTCGATCAGCA	D

Tdap1.Rv	AAGAGCTTGTGTCGGATGAACTGTCGGCTG ATGAGCCGATTCTCAATTTACAATGGCCG	R
mResist.Fw	ATCCCCATGAATGACGCACCCGTATCGGCC ATTGTAAATTGAGGAATCGGCTCATCAGCC	D
mResist.Rv	GAAAACAAATACCTTGCTGATCGAAAGGAGA GCTAAAAGTAGTATCATGAGAGATGACGG	R
down.Fw	ACATCTGTTGACCATCACCATCATCTCCGTC ATCTCTCATGATACTACTTTTAGCTCTCC	D
down.Rv	CAAGACTGTCAAGGAGGGTATTCTGGGCCT CCATGTCGTTAACGAACGATCAACAGCGAG	R
H2.Fw	GCCGTGTTTGAATGCAAGTTTGCTCGCTGTT GATCGTTCGTTAACGACATGGAGGCCAG	D
B.2 Rv	GGGGAAGGTGTTTCACTGCCTTATGCAAG CACCGGTTAACCATTGCGAATACCGCTTCC	R

Partidores para generación de v-CYP61HA-Z

B2CYP61.Rv	AAAAGAGTGCGTTAATAGGCCACAAACCTGA TTCCGTTAACCATTGCGAATACCGCTTCC	R
UPCYP61.Fw	TTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTCC CAATGGTTAACGGAATCAGGTTTGTGGCC	D
assCYP61.Rv	CATAGGGATAGCCAGCGTAATCTGGAACAT CGTATGGGTAGAAGGAAGGTTTAGGTCTGAG	R
3xHACYP61.Fw	TGGTCTTCACCTCAAGTTTACCCCTCGACCT AAACCTTCCTTCTACCCATACGATGTTCC	D
3xHACYP61.Rv	AGGTATGTATAGAGAGATGATAAGCCAGATA GGTGCTCATTTCAAGCGTAATCTGGAACG	R
tCYP61.Fw2	ATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGA TTACG CTTGAAATGAGCACCTATCTGGCT	D
tCYP61.Rv	AAGAGCTTGTGTCGGATGAACTGTCGGCTG ATGAGCCGATGTAACGGCGTTTCTTCTGC	R
mresistCYP61.Fw	TTCAATGCAGAACCAGAGTAACAATGCAGAA GGAAACGCCGTTACATCGGCTCATCAGCC	D
mresistCYP61.Rv	GAGGTATGTATAGAGAGATGATAAGCCAGAT AGGTGCTCATTTCATCATGAGAGATGACGG	R
DownCYP61.Fw	ATCTGTTGACCATCACCATCATCTCCGTCAT CTCTCATGATGAATGAGCACCTATCTGGC	D
DownCYP61.Rv	AGACTGTCAAGGAGGGTATTCTGGGCCTCC ATGTCGTTAACGACTCTGCTAAGGGAGATG	R
H2CYP61.Fw	GATGAGTCCTTTTTCTTCTCATCTCCCTTAG CAGAGTCGTTAACGACATGGAGGCCAG	D

Partidores para generación de v-CYP51HA-Z

B2CYP51.Rv	CAAAGGCGAAGAGGAAGAGAGAGTCCGGTA TTGGGGTTAACCATTGCGAATACCGCTTCC	R
UPCYP51.Fw	ACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATT CGCAATGGTTAACCCCAATACCGGACTCT	D
assCYP51.Rv	CATAGGGATAGCCAGCGTAATCTGGAACAT CGTATGGGTACGCGGCAGCCTTTCGAGGCT	R
3xHACYP51.Fw	TACCATCCACTACAGGAAGCGACAGCCTCG AAAGGCTGCCGCGTACCCATACGATGTTCC	D

3xHACYP51.Rv	AGAGAGGAGAAGAAGAACTTCTCAAGGAA	R
	AAGCGTCTGATTCAAGCGTAATCTGGAACG	
TCYP51.Fw2	TGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGAT	D
	TACGCTTGAATCAGACGCTTTTCCTTGAG	
tCYP51.Rv	AAGAGCTTGTGTCCGATGAACTGTCCGGCTG	R
	ATGAGCCGATTGTCTTCTAGCCAAACCCCG	
mResistCYP51.Fw	AGTCGATAGATGCTGGGCAGAGAAGCGGGG	D
	TTTGGCTAGAAGACAATCGGCTCATCAGCC	
mResistCYP51.Rv	CTTTTCTTGCTTGTCTCACTCTGGAAATTTCA	R
	TCATCGTCTCCATCATGAGAGATGACGG	
DownCYP51.Fw	GGAGACGATGATGAAATTTCCCTGTTGACCA	D
	TCACC ATCATCTCCGTCATCTCTCATGAT	
DownCYP51.Rv	GACTGTCAAGGAGGGTATTCTGGGCCTCCA	R
	TGTCGTTAACTAGAAGTTATGGATCCCGCG	
H2CYP51.Fw	TAGAGATCCTATTCTCTTGCGCGGGATCCAT	D
	AACTTCTAGTTAACGACATGGAGGCCAG	

Secuencia 3XFLAG y 3XHA

Flag3x.F	GACTACAAAGACCATGACGGT	D
Flag3x.R	TTTATCGTCGTCATCTTTG	R
3xHA.Fw	TACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGCT	D
	ATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGA	
3xHA.Rv	TCAAGCGTAATCTGGAACGTCATATGGATAG	R
	GATCCTGCATAGTCCGGGACGTCATAGGG	
Haseq.F	TACCCATACGATGTTCCAG	D
Haseq.R	AGCGTAATCTGGAACGTC	R

PCR en tiempo Real (qPCR)

<i>crtS</i>		
crtS_RT.F	TATCTCTGGACCCAGAGCTTGC	D
crtS_RT.R	ACCTGCAAACGCATCTGGTAC	R
<i>CYP61</i>		
RT_CYP61.F	CATGGAAGGTTCCACGCCGAGTAT	D
RT_CYP61.R	AAAGACCCGGAGGGAAGTTTCCAT	R
<i>CYP51</i>		
RT-CYP51.F	CAGCTCGCTCAGTTGATTCCTAGA	D
RT-CYP51.R	ATGTGAACAGATCGCCGTGCTT	R
<i>crtR</i>		
mcrfRF-RT	CTGGGAAACAAGACC	D
mcrfRR-RT	CGGAACCTCGGTTACG	R
<i>Actina</i>		
mActF-RT	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	D
mActR-RT	TCACCAACGTAGGAGTCCTT	R

D = Directo; R = Reverso.

2.5.1 Amplificación por PCR

La amplificación de DNA mediante PCR con la enzima *Taq* DNA polimerasa (purificada en el Laboratorio de Genética) se utilizó para el análisis de los plásmidos generados en este trabajo y de los distintos clones obtenidos de las transformaciones de *X. dendrorhous*. Los fragmentos de DNA que posteriormente fueron ensamblados mediante la técnica de *DNA assembler*, se amplificaron con la enzima *Pfu* DNA polimerasa (purificada en el Laboratorio de Genética). En ambos casos, la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l, la cual incluye: buffer de PCR 1X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), $MgCl_2$ 2 mM, buffer de carga BCP 1X (Rojo cresol 100 mM, Glicerol 8,3%), 200 μ M de cada deoxinucleótido (dNTP), 1 μ M de cada partidor, 1U de enzima DNA polimerasa (*Taq* o *Pfu*) y 10-20 ng de DNA molde. Para las reacciones de PCR de colonia, se utilizó una colonia como DNA molde en cada reacción.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystem 2720 con el siguiente programa estándar: denaturación inicial a 94°C por 3 min (en el caso de PCR de colonia fue por 5 min), 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, alineación de partidores a 55°C por 30 s, y la elongación a 72°C por 3-4 min dependiendo del tamaño del amplificado. Luego de los 35 ciclos, se realizó una elongación final a 72°C, para finalmente mantener la reacción a 4°C hasta su análisis.

El PCR de elongación (OE-PCR, *Overlap Extension* PCR) se utilizó para la amplificación de la secuencia que codifica al epítipo HA. Para ello, se utilizó la reacción de PCR anteriormente descrita utilizando *Pfu* DNA polimerasa, en la cual no se utilizó DNA molde sino dos partidores que hibridan entre sí. El programa utilizado fue el siguiente: denaturación inicial a 94°C por 1 min, seguido de 10 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, alineamiento de partidores a 55°C por 45 s, elongación a 72°C por 90

s, finalmente la reacción se mantuvo a 4°C. Luego, la mezcla de reacción obtenida se amplificó en una reacción de PCR estándar con *Pfu* DNA polimerasa, en un volumen final de 75 µl.

2.5.2 Síntesis de cDNA (RT-PCR)

Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima *Maxima Reverse Transcriptase* (ThermoScientific) siguiendo las instrucciones del proveedor en un volumen final de 20 µl. Se determinó la concentración de RNA utilizando un lector de microplaca EPOCH, con lo cual se estableció el volumen necesario para tener 5 µg de RNA en cada reacción. Al volumen de RNA se le adicionó agua estéril para completar un volumen de 11 µl. A esta mezcla se le añadió 2 µl del mix 1: 1 de oligo-dT (25 µM) y dNTPs (10 mM), y se incubó a 65°C por 5 min. Luego, se dejó a 4°C por 3 min y se agregó 6 µl del mix 4: 2 de buffer RT 5X y DTT (0,1M), más 1 µl de enzima. Se incubó a 37°C por 52 min y luego a 70°C por 15 min, dejando enfriar a 4°C.

2.5.3 PCR en tiempo real (qPCR)

El PCR en tiempo real se realizó en el equipo Mx 3000P (Stratagene). Para ello se utilizó 10 µl de mezcla del kit SensiMix SYBR Green I (Quantance), 8 µl de agua estéril, 1 µl de cDNA y 1 µl de mezcla de partidores directo y reverso (10 µM), obteniendo un volumen final de 20 µl. Los partidores utilizados poseían una eficiencia mayor al 95%, determinada en curvas estándares con un coeficiente de correlación de $R^2 \geq 0,99$. Para evaluar los niveles de transcritos, los valores de Ct (*threshold cycle*) se normalizaron respecto al valor obtenido del gen *ACT* (Genbank: X89898.1) de *X. dendrorhous*, y se expresaron en función de las condiciones control usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

3. Transformación de cepas bacterianas y levaduras

3.1 Transformación mediante electroporación de *E. coli*

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un cultivo de *E. coli* DH5 α crecido en medio LB con ácido nalidíxico (15 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C en fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,4-0,6; Sambrook & Russell, 2001). Las células se colectaron por centrifugación a 10.000 rpm a 4°C por 5 min y se lavaron dos veces con 300 ml de agua fría estéril, y una vez con glicerol al 10% (v/v). Finalmente, las células se suspendieron en 1-2 ml de glicerol 10% (v/v) y se fraccionaron en alícuotas de 40 μl en tubos Eppendorf que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Para la electroporación, una alícuota de células electrocompetentes se mezcló con 4 μL de DNA plasmídico o 8 μL de DNA de *S. cerevisiae* y fueron trasferidos a una cubeta de electroporación de 2 mm. Se aplicó un pulso de 2.500 V, 25 μF y 200 Ω utilizando el electroporador BioRad Gene Pulser X Cell. Posteriormente, se agregó 1 ml de medio LB y se incubó durante 45 min-1 h a 37°C. Finalmente, las células se sembraron en medio LB-agar con Ampicilina y X-gal, y se incubó a 37°C hasta la aparición de colonias.

3.2 Transformación mediante electroporación de *S. cerevisiae*

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un cultivo saturado de *S. cerevisiae* crecido en medio YEP a 30°C con una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1,3-1,5 (18 h de cultivo, aproximadamente). Las células se colectaron por centrifugación a 10.000 rpm a 4°C por 3 min y se lavaron dos veces con agua fría estéril con un volumen correspondiente a la mitad del volumen de cultivo utilizado. Posteriormente, éstas se lavaron con sorbitol 1 M frío estéril con un volumen correspondiente a $\frac{1}{4}$ del volumen de cultivo utilizado, para ser finalmente suspendidas en 1-2 ml de sorbitol 1M y separadas en fracciones de 100 μl para la transformación.

Para llevar a cabo la electroporación, la alícuota de células electrocompetentes se mezcló con 2 μ l de cada fragmento de PCR (previamente dializado) necesario para generar cada vector utilizando la técnica *DNA assembler*, y fueron transferidos a una cubeta de electroporación de 2 mm. Se aplicó un pulso de 1.500 V, 25 μ F y 200 Ω utilizando el electroporador BioRad Gene Pulser X Cell. Posteriormente, se agregó 900 μ l de medio YEP, se incubó 2 h a 30°C y finalmente se sembró en medio YEP-agar con el antibiótico G-418, incubando a 30°C hasta la aparición de colonias (2-3 días).

3.3 Transformación mediante electroporación de *S. pombe*

Para la obtención de células electrocompetentes de *S. pombe* se utilizó un cultivo crecido en medio EMM hasta fase exponencial (DO_{600nm} de 0,4-1,0). Las células se cosecharon centrifugando durante 3 min a 4.000 rpm y se lavaron con agua fría estéril con un volumen correspondiente a 1/2 del volumen del cultivo celular empleado; se centrifugó por 3 min a 4.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces. Luego, las células se lavaron con sorbitol 1M frío con un volumen correspondiente a 1/4 del volumen de cultivo utilizado, centrifugando 3 min a 4.000 rpm descartando el sobrenadante. Finalmente, Las células se suspendieron en 1-2 ml de sorbitol 1M frío y la mezcla se dividió en alícuotas de 80 μ L en tubos Eppendorf estériles.

Para llevar a cabo la transformación, una alícuota se mezcló con 3 μ L de DNA plasmídico (100 ng, aproximadamente) y se incubó en hielo durante 5 min. Luego, la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm y se procedió a dar el pulso eléctrico utilizando el electroporador BioRad Gene Pulser X Cell en las siguientes condiciones: 2.300 V, 25 μ F y 200 Ω . Inmediatamente se agregó 0,9 ml de sorbitol 1M frío a la cubeta, se transfirió la mezcla a un tubo Eppendorf estéril y se centrifugó durante 4 min a 6.000 rpm a 4°C. Las células se lavaron con 1 ml de agua estéril fría

repetiendo el paso de centrifugación en frío y se suspendieron en 1 ml de sorbitol 1M frío. Inmediatamente las células se sembraron en medio EMM-agar, incubando a 30°C hasta la aparición de colonias (3-4 días).

3.4 Transformación mediante electroporación de *X. dendrorhous*

La preparación de células electrocompetentes de la cepa silvestre y mutantes de *X. dendrorhous* se realizó mediante la recolección de células de cultivos en placa en medio YM-agar de aproximadamente 15-18 h. Las células se suspendieron en 10 ml de buffer fosfato de potasio (fosfato de potasio 50 mM pH 7, DTT 25 mM) y se incubaron a 22°C por 20 min. Luego, las células se colectaron por centrifugación a 4.000 x g por 4 min y se lavaron dos veces con 15 ml de solución STM (sacarosa 270 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM) previamente enfriada. El sedimento celular se suspendió en 1-2 ml de la solución STM y se fraccionó en alícuotas de 40 µl las cuales se almacenaron en tubos Eppendorf estériles mantenidos en hielo hasta su utilización.

Para llevar a cabo la electroporación, una alícuota se mezcló con 4-10 µL de DNA transformante (30 µg, aproximadamente). Luego, la mezcla se llevó a una cubeta de electroporación de 2 mm, y se dio el pulso eléctrico utilizando el electroporador BioRad Gene Pulser X Cell en las siguientes condiciones: 450 V, 125 µF y 600 Ω. Posteriormente, se adicionó 1 ml de YM y se incubó durante 4 h a 22°C. Finalmente, las células se sembraron en medio YM-agar con los respectivos antibióticos, incubando a 22°C hasta la aparición de colonias (3-5 días).

4. Extracción de carotenoides, esteroides y análisis mediante RP-HPLC

4.1 Extracción y cuantificación de carotenoides

La extracción de carotenoides se llevó a cabo según el método de extracción

con acetona (An y col., 1989). Para ello, 20 ml de un cultivo proveniente de un cultivo de *X. dendrorhous* se centrifugó a 4.000 x g por 5 min, eliminando el sobrenadante. El sedimento celular se lavó con agua destilada, para posteriormente ser suspendido en 1 ml de agua en tubos de 5 ml. A esta suspensión se le agregó 500 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm para proceder a una disrupción mecánica durante 3 min empleando el equipo Mini-beadbeater-16 (Biospect). Luego, se agregó 1 ml de acetona y nuevamente se realizó una disrupción mecánica durante 3 min. Posteriormente, se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se colectó el sobrenadante. Este procedimiento (extracción con acetona) se repitió hasta que el extracto celular quedara incoloro. Finalmente, se agregó 1/5 de volumen de éter de petróleo al tubo que contenía los sobrenadantes colectados, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 4.000 x g. La fase superior, correspondiente al éter de petróleo con los carotenoides, se transfirió a un tubo de vidrio y se determinó la absorbancia a 474 nm para la cuantificación total de los carotenoides. Los carotenoides totales se normalizaron respecto al peso seco de la levadura con la siguiente fórmula:

$$\text{pigmentos } (\mu\text{g}) / \text{g muestra (ppm)} = \frac{\text{volumen éter de petroleo (mL)} \cdot A_{474} \cdot 100}{21 \cdot \text{peso seco (g)} \cdot c \text{ (mL)}}$$

Donde A_{474} corresponde a la absorbancia medida a 474 nm, 21 corresponde al coeficiente de extinción $1\% = 2,100$ de astaxantina (An y col., 1989) y c corresponde al volumen de cultivo utilizado.

La composición de pigmentos carotenoides fue evaluada mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) en un equipo de HPLC con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A y una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck). Para ello,

se dejó evaporar el éter de petróleo del extracto de carotenoides, para luego suspender la muestra en 200 μ l de acetona, inyectando 20 μ l en el equipo. Se utilizó acetonitrilo: metanol: isopropanol como fase móvil en una proporción 75: 20: 5 (v/v), con un flujo de 1 ml/min en condiciones isocráticas. Los carotenoides se identificaron por sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo a estándares (Britton y col., 2004)

4.2 Extracción y cuantificación de esteroides

Para la extracción de esteroides se utilizó 5 ml de un cultivo de *X. dendrorhous*. Las células se centrifugaron a 4.000 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó con agua destilada. Luego, éste se suspendió con 16 ml de la siguiente solución: etanol 60% y 4 g KOH, dejando la solución a 80°C por 2 h en tubos de 50 ml a baño María. Luego, se agregó 10 ml de éter de petróleo, se mezcló en vórtex y se centrifugó por 5 min a 4.000 x g recuperando la fase superior (éter de petróleo). Para la cuantificación de esteroides se midió la absorbancia a 280 nm, normalizando respecto al peso seco de la levadura utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{esteroides } (\mu\text{g}) / \text{g muestra} = \frac{\text{volumen éter de petróleo (mL)} \cdot A_{280} \cdot 10^4}{11900 \cdot \text{peso seco (g)}}$$

Donde A_{280} corresponde a la absorbancia medida a 280 nm, 11.900 corresponde al coeficiente de extinción molar de ergosterol en acetona en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; 10^4 = constante de conversión de unidades $\mu\text{g/g}$.

La determinación de la composición de esteroides se realizó mediante RP-HPLC, donde se dejó evaporar el éter de petróleo del extracto de esteroides antes de inyectar la muestra. Como fase móvil se usó metanol: H_2O en proporción 97: 3 (v/v), con flujo

1ml/min en condiciones isocráticas. Los esteroides fueron reconocidos por sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo con estándares.

5. Extracción de proteínas

Las cepas CBS 6938, CBS Dap1-3xFLAG, CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA provenientes de *X. dendrorhous* y la cepa proveniente de *S. pombe* PEY901 con el plásmido pJE602, fueron utilizadas para los ensayos que requieren proteínas. Para el caso de las cepas provenientes de *X. dendrorhous*, éstas se cultivaron en medio YM a 22°C con agitación constante por 72 h, tomando muestras de 3 ml de cultivo, los cuales se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C. Los sedimentos celulares obtenidos se trataron con 250 µl de tampón de lisis (NaHCO₃ 100 mM; Tritón X-100 0,5%; PMSF 1 mM; inhibidor de proteasas (Promega) 1X; TCEP 2mM) y 0,1 ml de perlas de vidrio (0,5 mm), con lo cual se realizaron 7 ciclos de disrupción mecánica durante 30 s empleando el equipo Mini-beadbeater-16 (Biospect), incubando las muestras entre cada ciclo en hielo por 1 min. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 4°C durante 20 min a 14.000 rpm, donde se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio. Para el caso de extracción de proteínas provenientes de *S. pombe*, se realizó el mismo procedimiento antes descrito, con la excepción de que ésta se cultivó en medio EMM y se realizaron solo tres ciclos de disrupción mecánica.

Las muestras de proteínas obtenidas fueron evaluadas en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie.

6. Co-inmunoprecipitación (Co-iP)

Para llevar a cabo las Co-inmunoprecipitaciones (Co-iP), se utilizó el kit Pierce™ Classic Magnetic IP/Co-IP (Thermo Scientific) junto con MagnaBind™ Magnet (Thermo

Scientific) como soporte magnético para la separación, siguiendo las instrucciones del proveedor. Para ello, 300 μ l de proteínas obtenidas de cada cepa (Fracción *Input*, FI) se incubaron por una noche a 4 °C con 2 μ g del anticuerpo monoclonal ANTI-FLAG M2 (Sigma). Al día siguiente, 50 μ l de perlas magnéticas (unidas a proteína A/G) se lavaron con iP lysis/wash buffer, se incubaron 3 min a temperatura ambiente con agitación constante y se colocaron por 1 min en el soporte magnético para la separación del sobrenadante, el cual fue descartado. Este procedimiento se realizó dos veces utilizando 175 μ l y luego 1 ml del buffer. Posteriormente, las muestras de proteínas-ANTI-FLAG se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente con agitación constante por 3 h con las perlas magnéticas previamente lavadas. Luego, las muestras se separaron utilizando el soporte magnético, guardando el sobrenadante (Fracción *Unbound*, FU). Posteriormente, las perlas magnéticas se lavaron dos veces con iP lysis/wash buffer (500 μ l por vez) y una vez con 500 μ l de agua ultra pura, descartando todas las veces el sobrenadante. Finalmente, se adicionó 100 μ l de Lane Marker Sample Buffer (previamente diluido) incluido en el kit, se incubó 10 min a temperatura ambiente y se separó utilizando el soporte magnético, guardando el sobrenadante (Fracción *Bound*, FB).

Para asegurar que la inmunoprecipitación se debe al reconocimiento específico del epítipo FLAG y no por la región constante del anticuerpo ANTI-FLAG M2, el mismo procedimiento descrito se realizó utilizando un anticuerpo del mismo isotipo (anticuerpo IgG1) como control, pero de especificidad no conocida.

7. Western blot

Los ensayos de *Western Blot* para evaluar la presencia de las proteínas Dap1-FLAG, Cyp61-HA, Cyp51-HA y ubiquitina en las distintas cepas en estudio, se realizó

mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (10% para la visualización de Cyp61-HA, Cyp51-HA y 15% para la visualización de Dap1-FLAG y ubiquitina). Luego, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia por 30 min a 15 V. Posteriormente, la membrana se bloqueó con leche en polvo sin grasa al 3%, disuelta en TBS 1X (20 mM Tris and 150 mM NaCl pH 7,6) cuando se utilizó para revelar el anticuerpo ANTI-FLAG o ANTI-Ubiquitina; o disuelta en PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM pH 7,4) cuando se utilizó ANTI-HA como anticuerpo para revelar. Independiente del caso, cada membrana se bloqueó por 1 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana se lavó 1 vez con TBS 1X o PBS 1X según correspondía, para finalmente incubar toda la noche con el anticuerpo.

Cuando se utilizó el anticuerpo ANTI-FLAG o ANTI-Ubiquitina, luego de incubar las membranas toda la noche, éstas se lavaron una vez con TBS 1X, para luego ser incubadas 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Anti-mouse HRP (Santa Cruz Biotechnology) 1:5000 disuelto en TBS 1X más leche en polvo sin grasa 3%. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con TBS 1X con 0.05% TWEEN 20, 10 min por vez, para ser finalmente revelada. Cuando se utilizó el anticuerpo ANTI-HA, luego de incubar las membranas toda la noche, se lavaron 4 veces con PBS 1X con 0.05% TWEEN 20, 10 min por vez para ser finalmente reveladas.

La detección de las proteínas marcadas se realizó mediante un método quimioluminiscente. Para ello, las membranas se incubaron 1-2 min con 10 ml de una solución de 1,25 mM de luminol, 225 μ M de ácido p-cumárico y 100 mM de buffer Tris-HCl pH 8,5, iniciando la reacción con 3 μ l de H₂O₂, para ser finalmente reveladas en el equipo UVITEC NineAlliance del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias.

RESULTADOS

1. Identificación y análisis bioinformático del gen *DAP1* de *X. dendrorhous*.

Se analizó la base de datos genómica de nuestro laboratorio de la levadura *X. dendrorhous* con la herramienta BLAST del software CLC Genomics Workbench 5, utilizando como molde secuencias génicas disponibles en la base de datos Genbank para el gen *DAP1*. El gen homólogo identificado se denominó *DAP1*, el cual podría estar involucrado en la modulación de P450s en este microorganismo. La secuencia identificada comprende 4 exones de los siguientes tamaños: exón 1 de 364 pb, exón 2 de 61 pb, exón 3 de 14 pb y exón 4 de 68 pb; junto con 3 intrones de tamaños 123 pb, 77 pb y 101 pb, siendo por tanto de un tamaño de 808 pb desde el codón de inicio hasta el codón de término de la traducción. El tamaño de la región codificante sería de 507 pb (Figura 3).

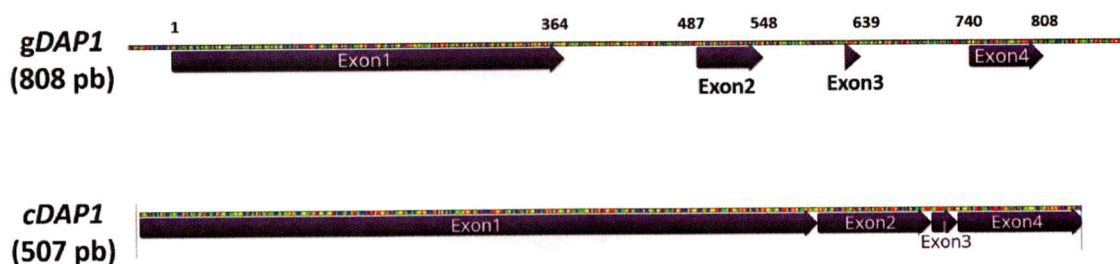


Figura 3. Estructura del gen *DAP1* de *X. dendrorhous*. El gen *DAP1* de *X. dendrorhous* se compone de 4 exones (en morado) y 3 intrones. La secuencia genómica de *DAP1* comprende 808 pb (*gDAP1*), mientras que el cDNA de 507 pb (*cDAP1*).

Utilizando el programa Geneious v10.2.4, se dedujo la secuencia proteica que codificaría *DAP1*, la proteína Dap1. Dap1 sería una proteína de 168 aminoácidos con un punto isoeléctrico de 4.30 y peso molecular de 18,617 KDa.

De acuerdo con lo observado en otros organismos, la proteína Dap1 posee un

segmento transmembrana en su porción N-terminal y un dominio citocromo b5 el cual le permitiría unir hemo. Utilizando el servidor TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), se identificó un segmento de transmembrana en su porción N-terminal entre los residuos 20-49.

Posteriormente, para buscar posibles dominios y motivos conservados, la secuencia de la proteína Dap1 se analizó en el servidor InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), el cual es una base de datos de familias, dominios y sitios funcionales de proteínas identificadas en proteínas conocidas, las cuales usa para buscar estos parámetros en nuevas secuencias de proteínas. Utilizando este servidor, se encontró que la secuencia proteica ingresada pertenece a la superfamilia del dominio de unión a hemo/esteroides tipo citocromo b5. El único dominio conservado identificado en la proteína fue el dominio de unión a hemo/esteroides tipo citocromo b5 en la porción C-terminal. Además, la secuencia ingresada la señala como asociada a la proteína PGRMC1. El servidor InterPro señala que la secuencia proteica de Dap1 de *X. dendrorhous* corresponde a una proteína no citoplasmática, con un péptido señal en el extremo N-terminal, pero no se predice función biológica ni molecular, ni lo identifica como un componente celular. Utilizando el servidor DeepLoc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/>), el cual predice posible localización subcelular de proteínas, la secuencia ingresada para Dap1 de *X. dendrorhous* la identifica como una proteína de membrana, en particular de retículo endoplásmico, con un 0,9036% de probabilidad. Este resultado difiere con lo obtenido por InterPro, pero se asemeja más a lo obtenido en otros organismos, que identifican a Dap1 o PGRMC1 como una proteína anclada en el retículo (Ryu y col., 2017).

Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple entre secuencias de proteínas de Dap1 o PGRMC1 identificadas en humano y las levaduras *S. pombe* y *S.*

cerevisiae (Figura 4).

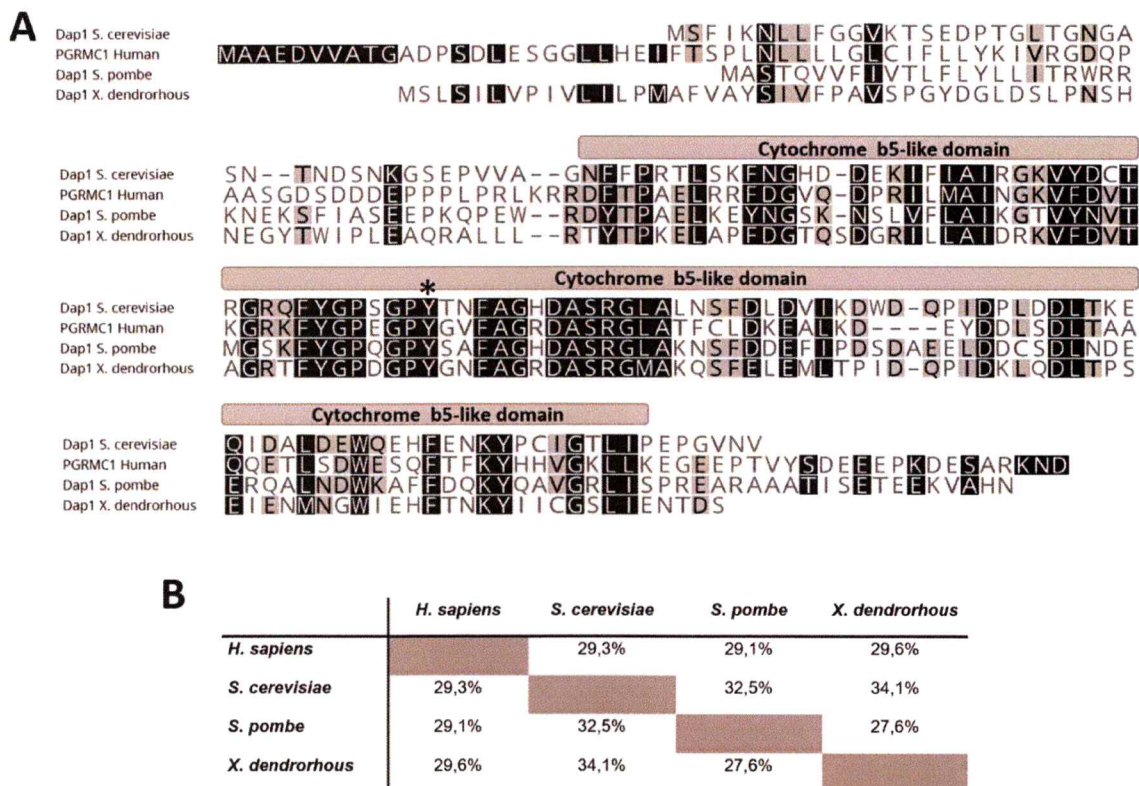


Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas de Dap1. Panel A, alineamiento de las secuencias PGRMC1 de *H. sapiens* (NP_006658.1), y Dap1 de las levaduras *S. cerevisiae* (NP_015155.1) y *S. pombe* (NP_594461.1). En la figura se indica el dominio tipo citocromo b5 encontrado en este tipo de proteínas. Con un asterisco se indica el residuo conservado necesario para la coordinación de hemo. Panel B, porcentaje de identidad de secuencias proteicas utilizadas. El alineamiento múltiple fue realizado utilizando el programa Geneious v10.2.4.

De acuerdo con lo identificado por Ghosh., 2005 y por Kabe., 2015, la proteína PGRMC1 necesita un residuo de tirosina (Y), la tirosina 113, para coordinar hemo. Según el alineamiento realizado, esta tirosina se encuentra conservada (en el dominio tipo citocromo b5, indicado en el cuadro rojo, Figura 4 panel A) en *X. dendrorhous*. Los porcentajes de identidad de secuencia se indica en el panel B, donde se muestra que Dap1 de *X. dendrorhous* posee un mayor porcentaje de identidad de secuencia con la proteína de *S. cerevisiae*, con un 34,1%, y el menor porcentaje de identidad de

secuencia con la proteína Dap1 identificada en *S. pombe*.

2. Construcción de la cepa CBS Δ dap1 y análisis de su fenotipo.

2.1 Generación de un vector con un módulo para la delección de *DAP1* de *X. dendrorhous*.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la eliminación del gen *DAP1* en *X. dendrorhous*, se construyó un módulo para su delección que permite reemplazar el gen mediante recombinación homóloga en la levadura por el módulo que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Para ello, se amplificaron las regiones de DNA río arriba y río abajo del *locus DAP1* de 662 pb y 642 pb desde el genoma de *X. dendrorhous* denominadas como *LADO A* y *LADO B*, respectivamente, insertando entre ellas un módulo que confiere resistencia al antibiótico higromicina B. Los *LADOS A* y *B* se amplificaron con partidores que permiten dejar el sitio de restricción *HpaI* entre ellas luego de ser unidas mediante OE-PCR. Así, el fragmento obtenido (*LADO A-LADO B*) se insertó en el sitio *EcoRV* del vector pBS, el cual fue posteriormente digerido con la enzima *HpaI* para integrar en el vector el módulo de resistencia a higromicina B entre las regiones *LADO A* y *LADO B*, generando el vector pBS- Δ g*DAP1-hph*. Una vez construido el vector, se transformó la cepa DH5- α de *E. coli*, seleccionando los clones transformantes recombinantes por su color y crecimiento en medio LB-agar suplementado con ampicilina y X-gal. Los clones fueron analizados mediante PCR de colonia, donde los clones positivos fueron utilizados para realizar extracción de DNA plasmídico donde se verificó a mayor profundidad mediante PCR y digestión enzimática la correcta construcción del vector. El diseño del vector se muestra en la Figura 5, junto con la amplificación de los fragmentos *LADO A* y *LADO B*.

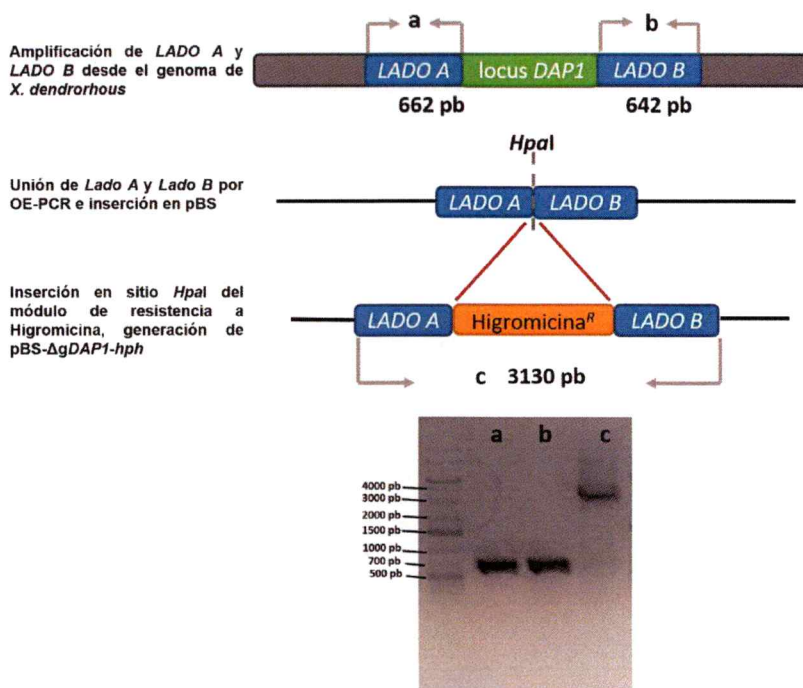


Figura 5. Construcción del vector pBS- Δ gDAP1-*hph* y su análisis. En la imagen se indica la metodología empleada para generar el vector pBS- Δ gDAP1-*hph* junto con la amplificación de los fragmentos *Lado A* (a), *Lado B* (b) y la amplificación de *Lado A-LADO B* luego de insertar el módulo de resistencia a higromicina entre ellos (c). El marcador de peso molecular utilizado corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

2.2 Transformación de la cepa CBS 6938 de *X. dendrorhous* con el módulo para eliminar al gen *DAP1*.

La cepa parental CBS 6938 fue transformada con el vector pBS- Δ gDAP1-*hph*. Para ello, dicho vector fue digerido con las enzimas *SmaI* y *KpnI* para liberar el módulo de recombinación (Figura 6), el cual, en un evento de doble recombinación homóloga reemplaza el gen *DAP1* por el módulo de resistencia. Las colonias transformantes se identificaron por su crecimiento en medio YM-agar suplementado con 35 μ g/ml del antibiótico higromicina B. Para evaluar a los mutantes obtenidos, se extrajo DNA genómico y se verificó mediante PCR la eliminación del gen *DAP1* y la presencia del módulo de resistencia (Figura 6). La cepa finalmente obtenida se denominó CBS Δ dap1,

la cual se utilizó para los estudios posteriores.

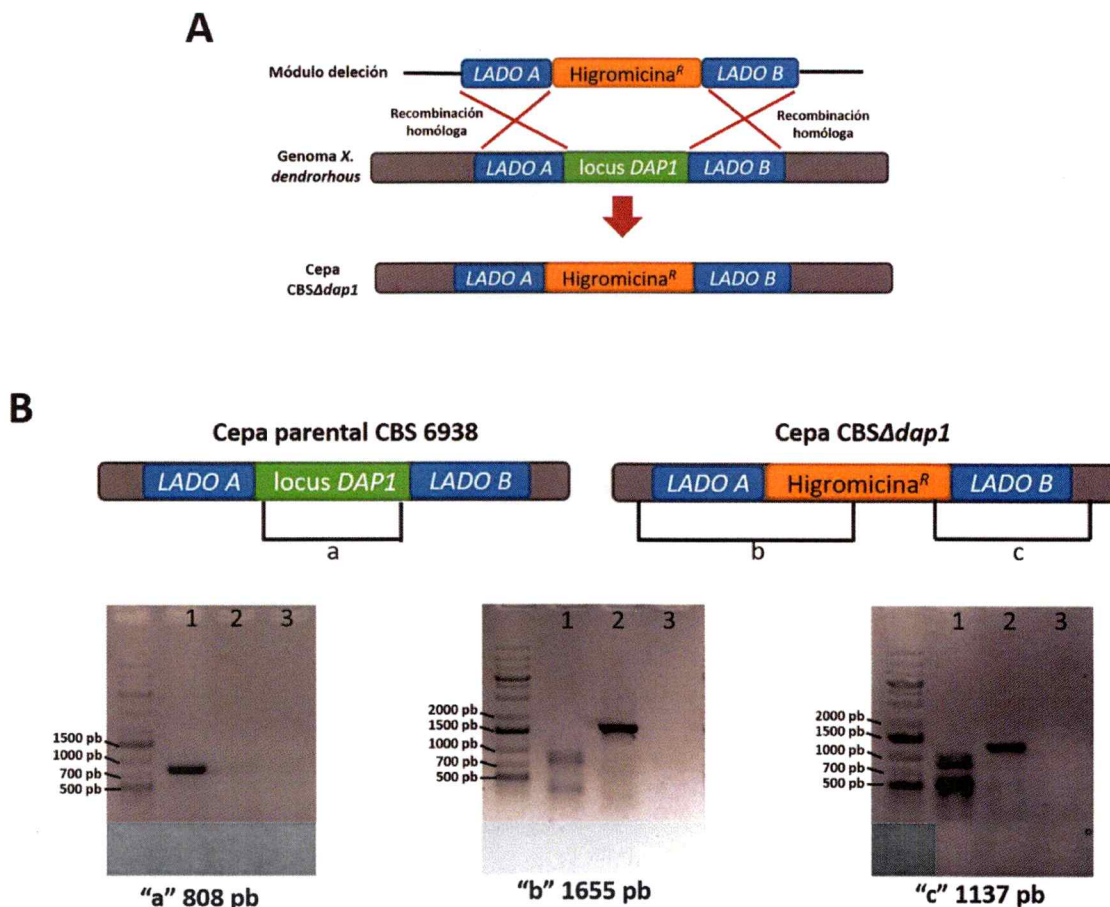


Figura 6. Generación y análisis de la cepa CBS Δ dap1. En el panel A, se indica el evento de recombinación necesario para la generación de la cepa CBS Δ dap1, donde el gen *DAP1* es reemplazado mediante un evento de doble recombinación homóloga por el módulo que confiere resistencia al antibiótico Higromicina B. Panel B, análisis mediante PCR de la cepa transformante, denominada CBS Δ dap1. Para cada análisis se utilizaron los partidores indicados en la figura y como DNA molde se usó: DNA de la cepa silvestre CBS 6938 (carril 1), de la cepa CBS Δ dap1 (carril 2) y agua como control negativo (carril 3). El marcador de peso molecular utilizado corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

2.3 Evaluación de la cepa CBS Δ dap1 en cuanto al fenotipo de color y crecimiento en medios suplementados con azoles.

A simple vista se pudo observar que la deleción del gen *DAP1* en la levadura afecta la pigmentación de la cepa. Como se muestra en el panel A de la Figura 7, la

cepa *CBS Δ dap1* es más anaranjada que la cepa silvestre CBS 6938, indicando por tanto que en esta cepa la biosíntesis de carotenoides se encuentra alterada. Para evaluar su crecimiento en medios suplementados con azoles (compuestos que se han caracterizado como inhibidores de la biosíntesis de esteroides), se utilizaron las cepas CBS 6938, *CBS Δ dap1* y CBSTr. Esta última cepa posee una interrupción en el gen *crtR*, generando por tanto una copia no funcional de dicho gen (Alcaíno y col., 2008). Esta cepa se utilizó como control, ya que se conoce que el producto génico de *crtR* es un citocromo P450 reductasa (CPR) que interactúa con P450s y es la encargada de donar los electrones necesarios para la actividad de las P450s. La cepa CBSTr es incapaz de producir el pigmento astaxantina y la proporción de ergosterol disminuye respecto a la cepa silvestre, ya que acumula otros dos intermediarios (Gutiérrez y col., 2015).

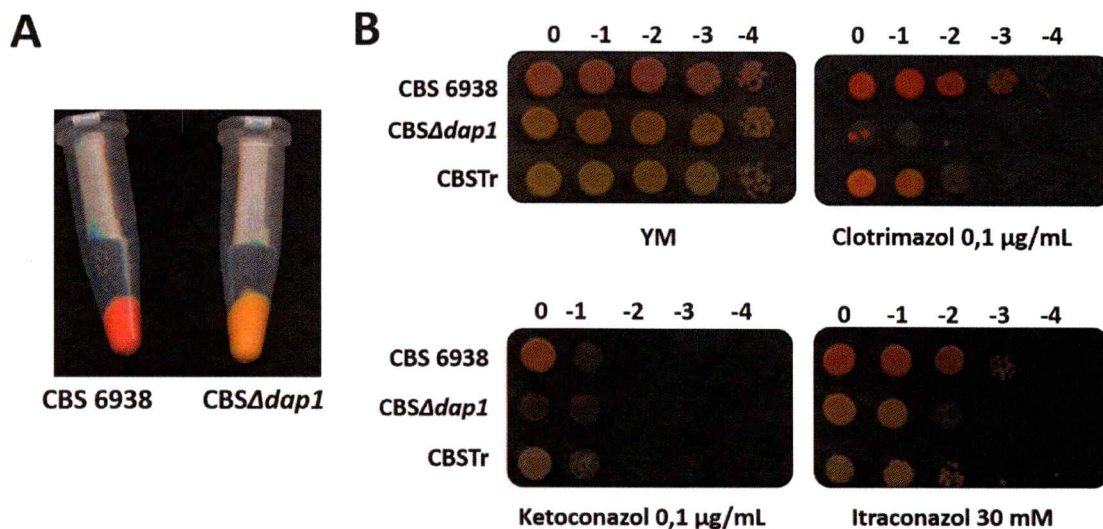


Figura 7. Análisis del fenotipo de color y crecimiento en medios YM-agar suplementados con azoles. Panel A, fenotipo de color de las cepas CBS 6938 (parental silvestre) y la cepa *CBS Δ dap1*. Panel B, crecimiento en placa de las cepas CBS 6938, *CBS Δ dap1* y CBSTr. Para ello, se sembró 5 μ l de diluciones seriadas de cultivos con un mismo título inicial para realizar microgotas sobre placas YM-agar suplementadas con los compuestos clotrimazol, ketoconazol o itraconazol en las concentraciones indicadas en la figura. Las diluciones se encuentran en orden creciente

hacia la derecha para cada cepa utilizando los distintos compuestos, en el siguiente orden: Sin diluir (0), y diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , indicadas en la figura como -1, -2, -3, y -4 respectivamente.

Se observa que la cepa *CBS Δ dap1* disminuye su crecimiento en medios YM-agar suplementados con 0,1 μ g/ml de clotrimazol, 0,1 μ g/ml de ketoconazol o 30 mM de itraconazol (Figura 7, panel B), al igual que la cepa CBSTr, pero esta disminución es mayor para la cepa *CBS Δ dap1*, sugiriendo por tanto que la vía de síntesis de esteroides se encuentra alterada en esta mutante.

2.4 Curva de crecimiento y análisis del contenido y composición de carotenoides y esteroides en la cepa *CBS Δ dap1*.

Se construyó una curva de crecimiento empleando las mismas cepas utilizadas en los análisis fenotípicos previos: CBS 6938, *CBS Δ dap1* y CBSTr. Las cepas se cultivaron en medio YM por 5 días (Figura 8), colectando muestras al final de la curva (fase estacionaria de crecimiento) para la extracción de carotenoides, esteroides y RNA.

Como se puede observar en la Figura 8, el crecimiento de la cepa *CBS Δ dap1* no se ve afectado, mostrando un comportamiento similar que el obtenido por las otras dos cepas, CBS 6938 y CBSTr, indicando por tanto que la delección de *DAP1* no genera un defecto en el crecimiento en la levadura *X. dendrorhous* bajo las condiciones estudiadas.

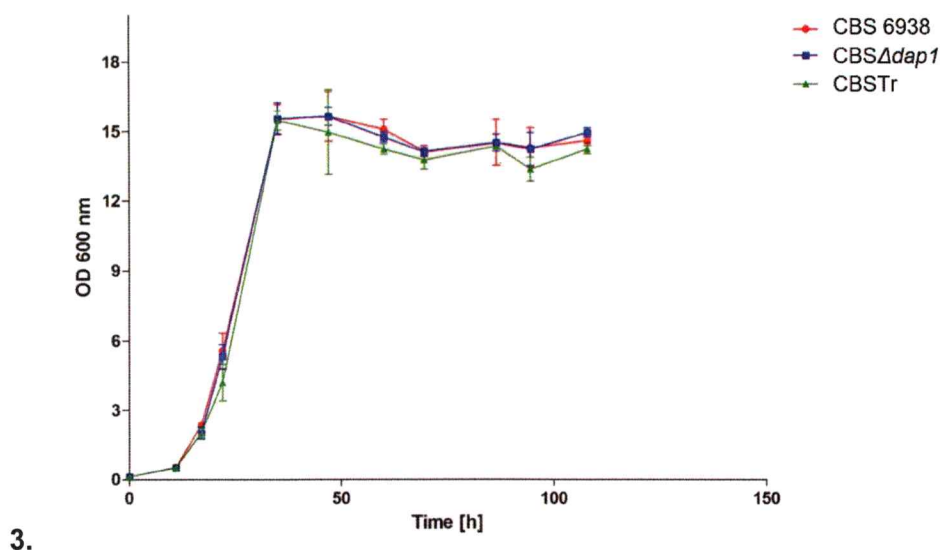


Figura 8. Curvas de crecimiento de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1 y CBSTr. Las cepas fueron cultivadas por triplicado en matraces de 250 ml con 100 ml de medio YM incubados a 22°C con agitación constante (150 rpm). En el gráfico se indica el promedio \pm desviación estándar para cada medición realizada.

Luego de 120 h de cultivo se tomaron muestras para la extracción de carotenoides y esteroides totales, los cuales fueron cuantificados espectrofotométricamente (Figura 9).

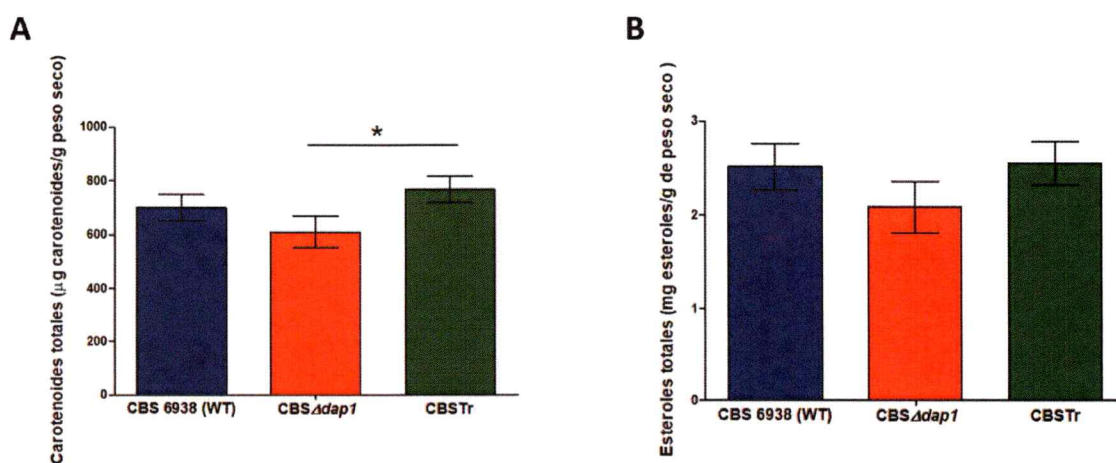


Figura 9. Cantidades de carotenoides y esteroides totales de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1 y CBSTr. Panel A, cantidad de carotenoides totales expresados en μ g de

carotenoides/ g de peso seco. Panel B, cantidad de esteroides totales expresados en mg de esteroides/ g de peso seco. En cada gráfico se indica el promedio \pm desviación estándar de los resultados de tres cultivos independientes de cada cepa. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas, (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Como se observa en el panel A de la Figura 9, el contenido de carotenoides totales en la cepa *CBS Δ dap1* no varía respecto a la cepa silvestre CBS 6938, observando solo diferencias significativas con la cepa CBSTr. Similarmente, no existen diferencias significativas entre el contenido de esteroides de la cepa *CBS Δ dap1* y las cepas controles, indicando que la producción de esteroides totales no cambia en *X. dendrorhous* cuando se elimina el gen *DAP1*.

La composición de carotenoides y esteroides, evaluada mediante RP-HPLC se indica en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 4. Composición de carotenoides de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1 y CBSTr luego de 120 h de cultivo.

Carotenoides	CBS 6938	CBS Δ dap1	CBSTr
% Astaxantina	81,9 \pm 2,3 ^a	2,8 \pm 0,5 ^b	N.O
% Intermediarios de Astaxantina	8,8 \pm 0,9 ^a	20,4 \pm 0,6 ^b	6,7 \pm 0,3 ^a
% β -caroteno	2,8 \pm 0,7 ^a	58,0 \pm 2,1 ^b	87,9 \pm 0,4 ^c
% Otros carotenoides	6,6 \pm 2,0 ^a	18,9 \pm 2,1 ^b	5,4 \pm 0,9 ^a

La tabla muestra el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes. Intermediarios de astaxantina hace referencia a los intermediarios en la síntesis entre este compuesto y β -caroteno, agrupando a Fenicoxantina, OH-equinenona, equinenona, y cantaxantina. Otros carotenoides hacen referencia a toruleno, OH-k-toruleno y otros carotenoides no identificados. N.O: no observado. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas. En la tabla se indican las diferencias significativas con $p < 0,01$, donde letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas analizando el mismo carotenoide, letras iguales indica que no hay diferencias significativas entre las cepas analizando el mismo carotenoide.

Tabla 5. Composición de esteroides de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1 y CBSTr luego de 120 h de cultivo.

Esteroides	CBS 6938	CBSΔdap1	CBSTr
% Ergosterol	98,7 \pm 0,1 ^a	7,0 \pm 1,2 ^b	80,2 \pm 1,9 ^c
% Esterol ND1	N.O	25,8 \pm 1,0 ^a	12,9 \pm 0,8 ^b
% Esterol ND2	N.O	67,2 \pm 0,19 ^a	6,9 \pm 1,3 ^b

La tabla muestra el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes. Esterol ND1 hace referencia a un esteroide no identificado con un tiempo de retención de aproximadamente 14 min, Esterol ND2 hace referencia a un esteroide no identificado con un tiempo de retención de aproximadamente 20 min. N.O: no observado. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas. En la tabla se indican las diferencias significativas con $p < 0,01$, donde letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas analizando el mismo esteroide, letras iguales indica que no hay diferencias significativas entre las cepas analizando el mismo esteroide.

Al analizar la composición de carotenoides (Tabla 4), se observa que la cepa silvestre produce principalmente astaxantina (82% aproximadamente) al contrario que la cepa CBSTr, la cual al no poseer una CPR funcional para donar electrones a la P450 CrtS, es incapaz de generar este pigmento. En la cepa CBS Δ dap1 se genera un fenotipo intermedio, donde la cepa si es capaz de producir astaxantina, pero la proporción de este compuesto disminuye drásticamente a un 3% aproximadamente, acumulándose principalmente el sustrato de la P450 CrtS, β -caroteno (alrededor de un 58%).

Al analizar la composición de esteroides (Tabla 5), se observa que la cepa silvestre produce como principal esteroide al ergosterol. En cambio, la proporción de ergosterol disminuye aproximadamente a un 80% en la cepa CBSTr, acumulándose otros dos intermedios no caracterizados, denominados de ahora en adelante como ND1 y ND2, respectivamente. Al igual que en CBSTr, la proporción de ergosterol disminuye en la cepa CBS Δ dap1, pero la disminución es mayor, a un 7% aproximadamente, acumulando los mismos intermedios, ND1 y ND2 (verificado mediante co-inyección de las muestras en el equipo HPLC, datos no mostrados).

De esta manera, la eliminación de *DAP1* en *X. dendrorhous* no afecta la cantidad

de carotenoides ni de esteroides totales cuando se compara con la cepa parental, pero disminuye la proporción de los productos finales de la biosíntesis de carotenoides y esteroides: astaxantina y ergosterol, en cuyas vías de síntesis participan enzimas P450s.

2.5 Análisis de la expresión de transcritos de P450s y donador de electrones CrtR en la cepa CBS Δ dap1.

Una vez realizada la curva de crecimiento y analizado el contenido y composición de carotenoides y esteroides producidos por la cepa CBS Δ dap1, se examinó los niveles de transcrito de genes de P450s identificados y caracterizados en *X. dendrorhous*: Cyp51 y Cyp61, involucrados en la biosíntesis de esteroides, CrtS, involucrado en el último paso de la biosíntesis de astaxantina. Además, se evaluó los niveles de transcrito de *crtR*, del donador de electrones de P450s (excepto en la cepa CBSTR, dado que tiene mutado este gen). Para ello se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y éste se utilizó para analizar la expresión relativa a nivel de transcritos mediante RT-qPCR (Figura 10).

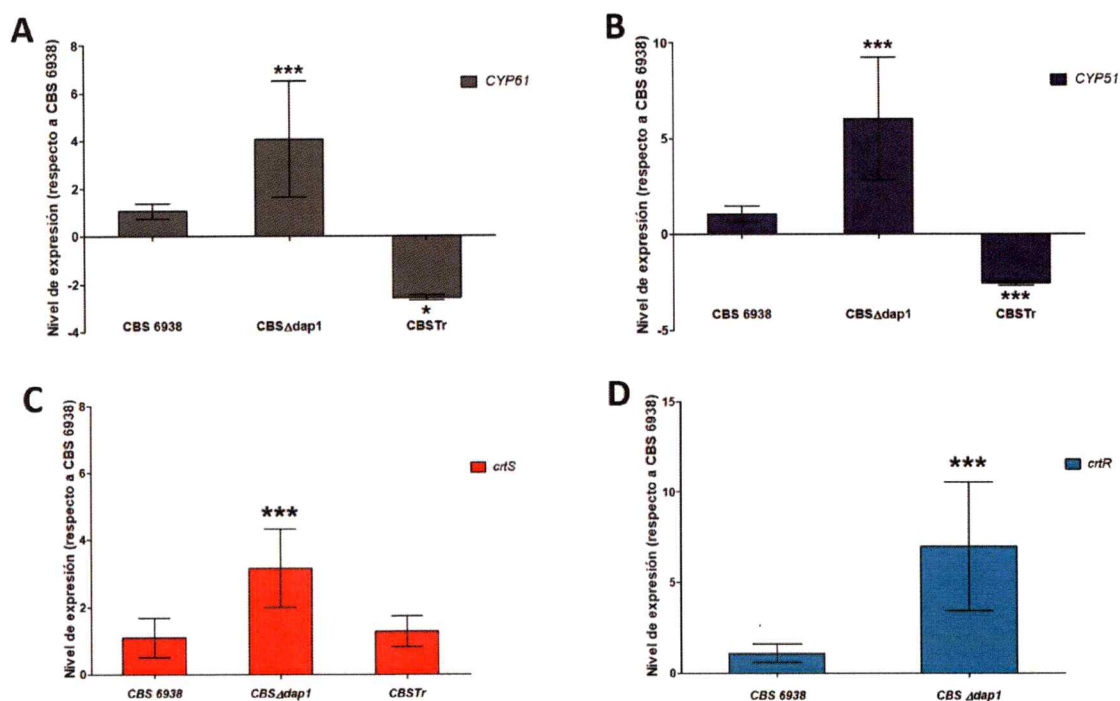


Figura 10. Nivel de expresión de los genes *CYP61*, *CYP51*, *crtS* y *crtR* evaluado mediante RT-qPCR. Los niveles de transcrito fueron analizados en las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1, CBSTr. Niveles relativos de transcrito del gen *CYP61* (panel A), *CYP51* (panel B), *crtS* (panel C) y *crtR* (panel D). Los valores graficados corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes para cada cepa. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Como se observa en los paneles A, B, C y D de la Figura 10, los niveles de transcrito de los genes de las P450s analizados y del donador de electrones CrtR se encuentran aumentados en la cepa CBS Δ dap1, siendo estas diferencias significativas cuando se comparan con la cepa silvestre CBS 6938. Como se observó en la Tablas 4 y 5, la delección de *DAP1* disminuye la producción tanto de astaxantina como de ergosterol, por lo que presumiblemente en esta cepa la vía SREBP se encuentra activa. La vía SREBP está encargada de modular la homeostasis de esteroides en mamíferos y de acuerdo con los antecedentes en nuestro laboratorio, participaría en la regulación

de la expresión de genes en las vías antes mencionadas en esta levadura. De esta manera, a pesar de que los niveles de transcrito de genes de sistemas P450s se encuentran aumentados en la cepa CBS Δ dap1, esto parece no ser suficiente para producir los niveles de ergosterol y astaxantina silvestres en la cepa, por lo que el efecto de Dap1 en la regulación de la síntesis de ergosterol y astaxantina no es a nivel transcripcional. Posiblemente, y de acuerdo con la literatura (Hughes., 2007), Dap1 estaría involucrado en la regulación de enzimas P450s a nivel de la proteína.

2.6 Análisis de crecimiento en cepas suplementadas con Hemina.

De acuerdo con antecedentes (Mallory y col., 2005), en *S. cerevisiae* la adición exógena de hemina (nombre farmacológico de hemo) en mutantes Δ dap1 es suficiente para revertir el fenotipo observado (deficiente en crecimiento en medios con MMS, compuesto utilizado para estudios de reparación de DNA en levaduras), ya que, de acuerdo con lo postulado, la adición exógena de este compuesto sería suficiente para estabilizar a la proteína Cyp51. Para analizar si la adición exógena del compuesto es suficiente para revertir el fenotipo del mutante CBS Δ dap1, se evaluó el crecimiento de esta cepa en medio YM-agar suplementada con este compuesto. Para ello, la cepa fue crecida en YM-agar suplementado con concentraciones crecientes de hemina, como se indica en la Figura 11. Como se visualiza en la figura, al aumentar la concentración de hemina (30, 60, 90 μ g/ml), no se observa un cambio en el fenotipo de color en la cepa CBS Δ dap1 al compararla con la cepa silvestre CBS 6938: la primera es más anaranjada que la segunda. Para evaluar si hay algún posible efecto en la biosíntesis de esteroides, se utilizó medios suplementados con hemina y clotrimazol, ya que éste último compuesto inhibe la síntesis de ergosterol y la cepa CBS Δ dap1 es más sensible a este compuesto que la cepa silvestre (Figura 7). Como se observa en la Figura 11,

panel B, no se afecta el crecimiento cuando la cepa *CBS Δ dap1* es crecida en medio YM-agar, o medio YM-agar suplementado con 13 μ g/ml de hemina. Sin embargo, cuando la cepa es cultivada en medio YM-agar suplementado con 0,1 μ g/ml de clotrimazol, *CBS Δ dap1* disminuye su crecimiento al compararla con la cepa silvestre CBS 6938 y este fenotipo se revierte cuando además de adicionar clotrimazol, se adiciona hemina, sugiriendo que la suplementación de hemina tiene un efecto positivo en la biosíntesis de esteroles en este mutante.

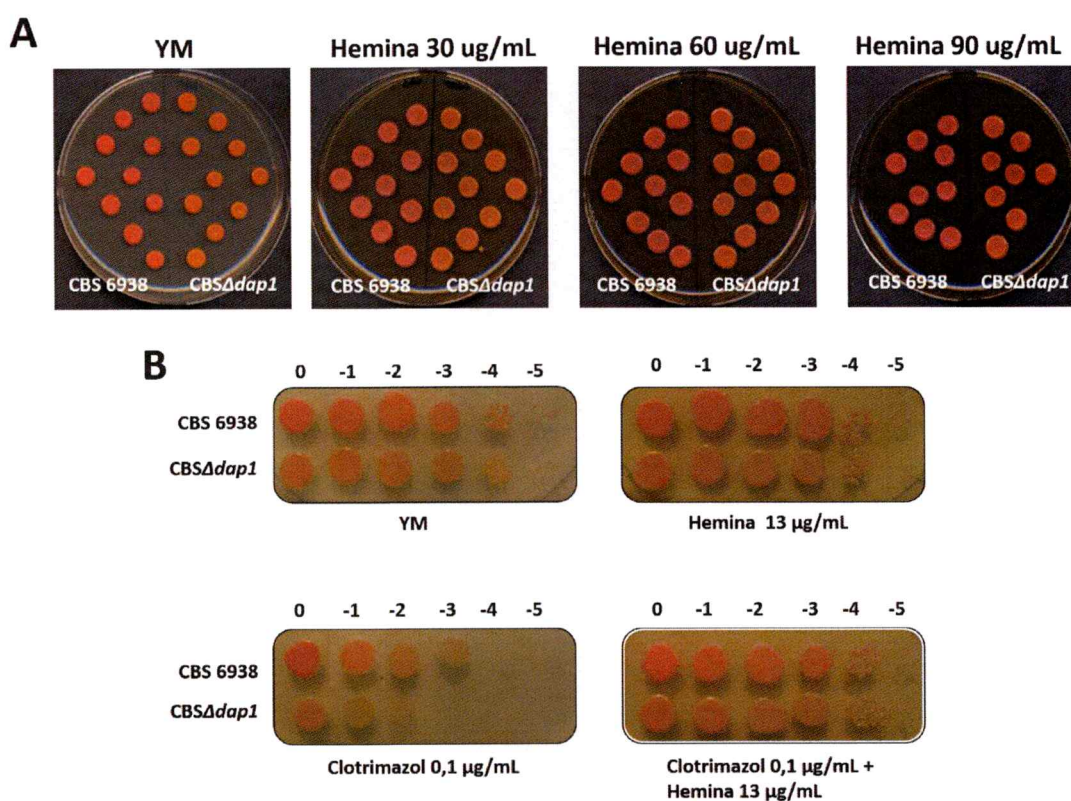


Figura 11. Análisis del fenotipo de color y crecimiento en medios YM-agar suplementados con hemina y/o clotrimazol. Panel A, crecimiento de las cepas CBS 6938 y *CBS Δ dap1* en medios suplementados con 30, 60 y 90 μ g/ml de hemina. Panel B, crecimiento en placa de las cepas CBS 6938, *CBS Δ dap1* y CBSTr. Para ello, se sembró 5 μ l de diluciones seriadas de cultivos para realizar la microgota, sobre placas YM-agar suplementadas con los compuestos hemina, clotrimazol o hemina más clotrimazol en las concentraciones indicadas en la figura. Las diluciones del cultivo se encuentran en orden creciente hacia la derecha para cada cepa utilizando los distintos compuestos, en el siguiente orden: Sin diluir (0), y diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ,

indicadas en la figura como -1, -2, -3, y -4 respectivamente.

Para evaluar la cantidad y composición de esteroides y carotenoides en la cepa *CBS Δ dap1* cuando es cultivada en medio suplementado con hemina a una concentración de 13 μ g/ml, ésta se cultivó en medio líquido YM por 30 h (fase exponencial de crecimiento, Figura 8). El contenido de carotenoides y esteroides totales presentes en estas condiciones se indican en la Figura 12.

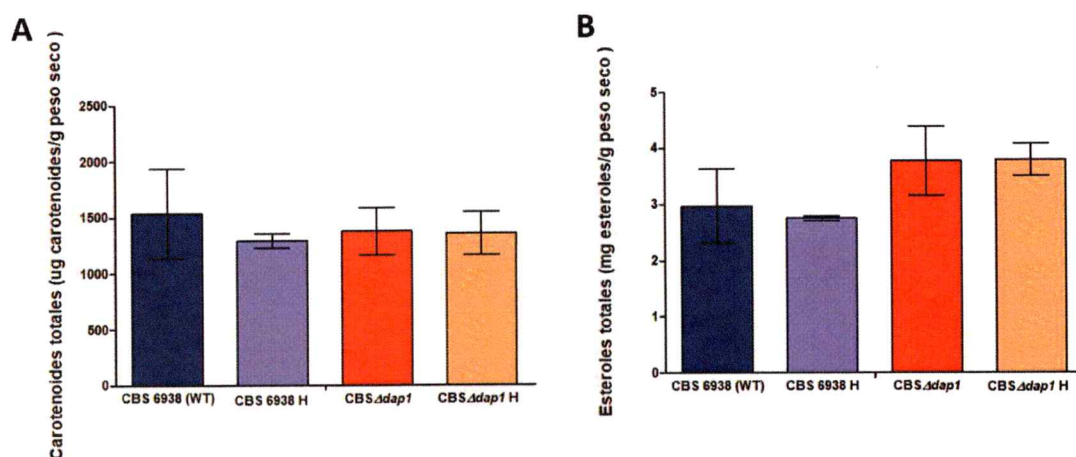


Figura 12. Cantidades de carotenoides y esteroides totales de las cepas CBS 6938 (WT) y CBS Δ dap1, en cultivos suplementados (H) o no con hemina. Panel A, cantidad de carotenoides totales expresados en μ g de carotenoides/ g de peso seco. Panel B, cantidad de esteroides totales expresados en mg de esteroides/ g de peso seco. La concentración de hemina (H) suplementada en cada cultivo fue de 13 μ g/ml. En cada gráfico se indica el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes para cada cepa. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas, (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Como se observa en el panel A de la Figura 12, la cantidad de carotenoides totales no varía al adicionar hemina al cultivo de la cepa *CBS Δ dap1*, hecho que se repite en la cepa silvestre, sin encontrar diferencias significativas entre las diferentes cepas y cultivos. Con respecto a los esteroides totales, se observa el mismo fenómeno: no existen diferencias significativas en la cantidad de esteroides totales al adicionar

hemina al medio de cultivo, como tampoco hay diferencias entre *CBSΔdap1* y la cepa parental.

Lo siguiente a analizar fue la composición de carotenoides y esteroides producidos en las cepas al adicionar hemina (Tabla 6 y 7 respectivamente).

Tabla 6. Composición de carotenoides de las cepas CBS 6938 y CBSΔdap1, luego de 30 h de cultivo suplementado (+ H) o no con hemina.

Carotenoides	CBS 6938	CBS 6938 + H	CBSΔdap1	CBSΔdap1 + H
% Astaxantina	51,3 ± 4,0 ^a	46,5 ± 2,2 ^a	1,4 ± 0,4 ^b	1,1 ± 0,9 ^b
% Intermediarios de Astaxantina	32,7 ± 3,6 ^a	32,5 ± 3,0 ^a	37,4 ± 2,1 ^a	40,4 ± 3,7 ^a
% β-caroteno	12,3 ± 4,7 ^a	17,7 ± 2,2 ^a	58,7 ± 2,9 ^b	56,0 ± 7,4 ^b
% Otros carotenoides	4,2 ± 0,7 ^a	3,4 ± 1,2 ^a	2,1 ± 0,6 ^a	2,5 ± 0,7 ^a

La tabla muestra el promedio ± desviación estándar de tres cultivos independientes. Intermediarios de astaxantina hace referencia a los intermediarios en la síntesis entre este compuesto y β-caroteno, agrupando a Fenicoxantina, OH-equinenona, equinenona, y cantaxantina. Otros carotenoides hacen referencia a toruleno, OH-k-toruleno y otros carotenoides no identificados. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas. En la tabla se indican las diferencias significativas con $p < 0,01$, donde letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas y/o condiciones analizadas para el mismo carotenoide, letras iguales indica que no hay diferencias significativas entre las cepas y/o condiciones analizadas para el mismo carotenoide.

Tabla 7. Composición de esteroides de las cepas CBS 6938 y CBSΔdap1, luego de 30 h de cultivo suplementado (+ H) o no con hemina.

Esteroides	CBS 6938	CBS 6938 + H	CBSΔdap1	CBSΔdap1 + H
% Ergosterol	99,3 ± 0,4 ^a	99,0 ± 0,6 ^a	6,3 ± 0,6 ^b	7,0 ± 0,9 ^b
% Esterol ND1	N.O	N.O	30,1 ± 3,0 ^a	29,2 ± 2,5 ^a
% Esterol ND2	N.O	N.O	63,6 ± 2,4 ^a	46,9 ± 3,6 ^b
% Esterol ND3	N.O	N.O	N.O	5,6 ± 1,3
% Esterol ND4	N.O	N.O	N.O	1,6 ± 0,3
% Esterol ND5	N.O	N.O	N.O	9,7 ± 3,2

La tabla muestra el promedio ± desviación estándar de tres cultivos independientes. ND: Esteroides no identificados, se indican sus tiempos de retención aproximados en min: ND1 (12), ND2 (17,2); ND3 (12,6); ND4 (14,5); ND5 (18,2) Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas. En la tabla se indican las diferencias significativas con $p < 0,01$, donde letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas y/o condiciones analizadas para el mismo esteroide, letras iguales indica que no hay diferencias significativas entre las cepas y/o condiciones analizadas para el mismo esteroide.

Como se puede observar en la Tabla 6, los resultados obtenidos son similares a los presentados en la Tabla 4: La proporción de astaxantina disminuye mientras que la de β -caroteno aumenta en la cepa *CBS Δ dap1*, respecto a la cepa parental. Cuando se adiciona hemina en los medios de cultivo de las cepas en estudio, no hay cambios significativos en la proporción de carotenoides observados cuando se compara con la misma cepa sin adicionar este compuesto al cultivo.

Con respecto a los esteroides, como se muestra en la Tabla 7, el mayor porcentaje de esteroides producidos por la cepa parental corresponde a ergosterol, con un 99,3%. Al adicionar hemina al cultivo de esta cepa, no hay acumulación de nuevos esteroides, siendo nuevamente el ergosterol el principal esteroide observado. Como se había mencionado, la cepa *CBS Δ dap1*, además de producir ergosterol acumula otros dos esteroides: ND1 y ND2, provocando la disminución drástica de la proporción de ergosterol en esta cepa respecto a la cepa silvestre. Al adicionar hemina al cultivo de esta cepa, si bien la proporción de ergosterol no cambia, aparecen otros tres esteroides (ND3, ND4 y ND5), los cuales en el cromatograma se visualizan como pequeños "hombros" que acompañan a los *peaks* obtenidos para ND1, ergosterol y ND2, respectivamente. La proporción de cada uno de estos esteroides es baja, y la suma de ellos no supera al 20% del total de esteroides producidos en esta cepa.

3 Construcción de la cepa *CBS Δ sre1 Δ dap1* y análisis de su fenotipo.

Como se observó en el punto 2.5, en el mutante *CBS Δ dap1* la vía SREBP posiblemente se encuentra activa debido al cambio de la composición de esteroides y el aumento de los niveles de transcritos de genes de proteínas de sistemas P450s observados que serían regulados por dicha vía. Para evaluar el efecto de la delección del gen *DAP1* en el mutante *CBS Δ sre1* (Gutiérrez, Tesis de Doctorado en progreso),

se construyó el mutante *CBSΔsre1Δdap1*. Para ello, se utilizó a la cepa *CBSΔsre1* como cepa parental que a su vez deriva de la cepa parental CBS 6938, la cual fue construida de manera análoga a *CBSΔdap1*: una región río arriba y río abajo, *UP* y *DOWN*, del gen *SRE1* fueron amplificadas insertando entre ellas un módulo de resistencia al antibiótico zeocina, para que, en un evento de doble recombinación homóloga, el gen *SRE1* sea reemplazado por el módulo generado. *CBSΔsre1* se transformó con el inserto del plásmido *pBS-ΔgDAP1-hph* como se describió previamente. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en medio YM-agar suplementado con higromicina B y zeocina, y a las colonias transformantes se les extrajo DNA y se analizó por PCR la correcta delección de *DAP1* (Figura 13). La cepa generada se denominó *CBSΔsre1Δdap1*, la cual presentó un cambio en la pigmentación respecto a la cepa parental *CBSΔsre1*: la cepa doble mutante es más anaranjada que *CBSΔsre1* similar a lo observado en la cepa *CBSΔdap1*, pero más clara (Figura 14).

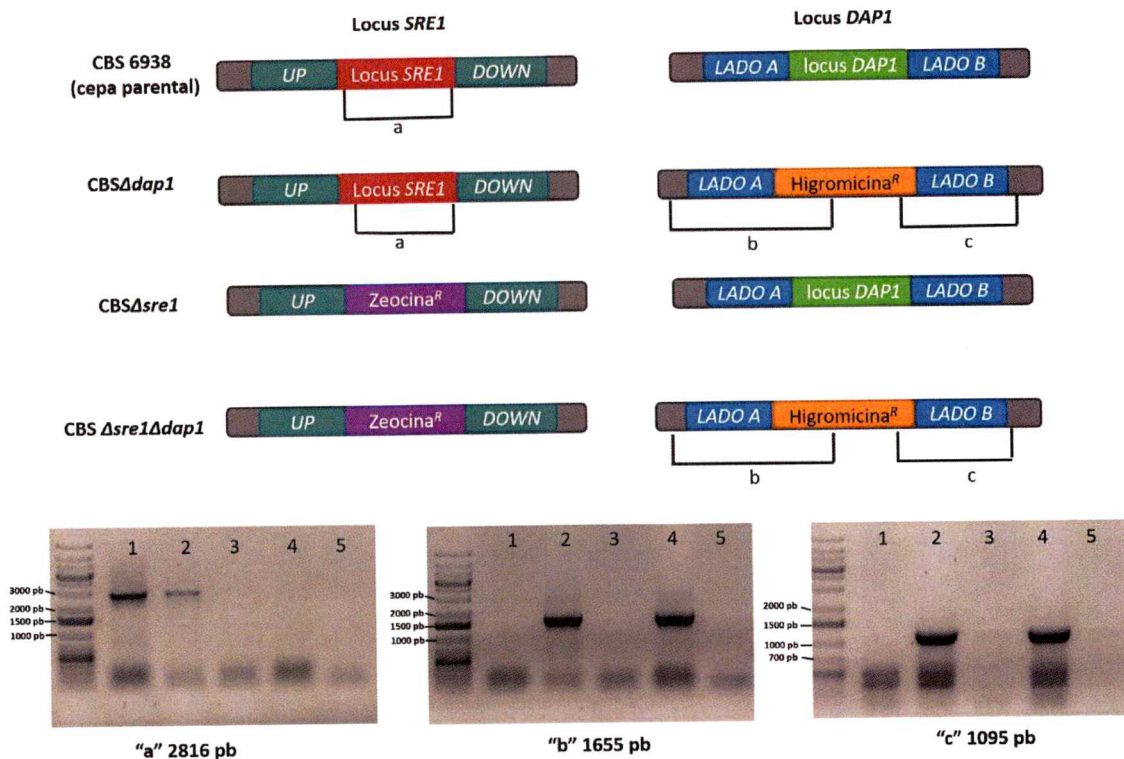


Figura 13. Análisis de la cepa CBS Δ sre1 Δ dap1. En la imagen, se esquematizan los loci *SRE1* y *DAP1* en las cepas CBS 6938 (cepa parental), CBS Δ dap1, CBS Δ sre1 y CBS Δ sre1 Δ dap1, donde se indica con las letras a-f las zonas amplificadas en los distintos análisis por PCR. Como DNA molde se usó: DNA de las cepas CBS 6938 (carril 1), CBS Δ dap1 (carril 2), CBS Δ sre1 (carril 3) y CBS Δ sre1 Δ dap1 (carril 4), y sin DNA como control negativo (carril 5). El marcador de peso molecular utilizado corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

Se analizó el crecimiento de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1, CBS Δ sre1 Δ dap1 y CBS Δ sre1 en medio YM-agar suplementado con compuestos azólicos (Figura 14).

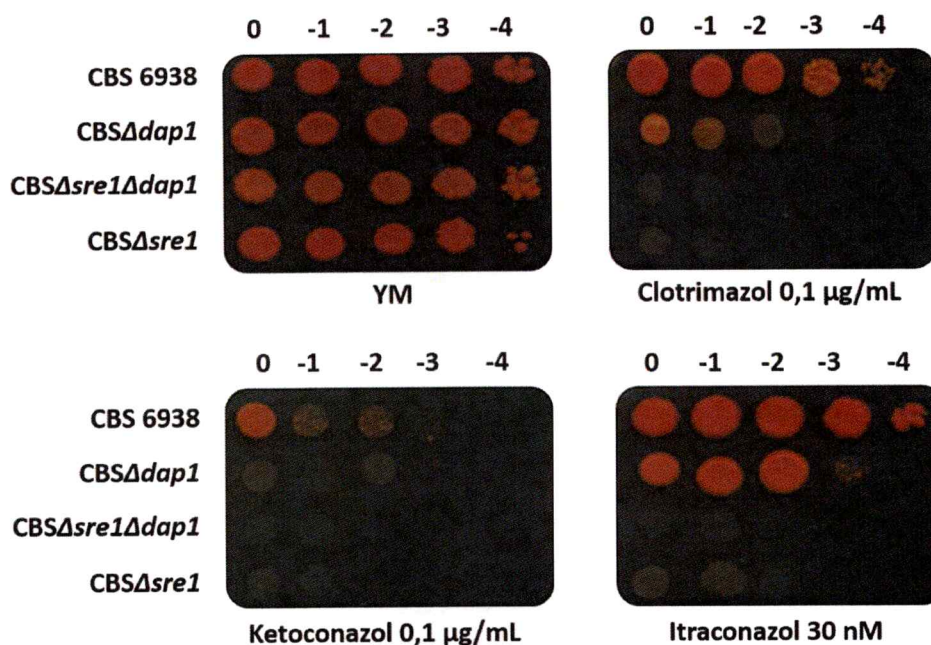


Figura 14. Análisis del fenotipo de color y crecimiento en medios YM-agar suplementados con azoles. En la imagen se muestra el crecimiento en placa de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1, CBS Δ sre1 Δ dap1 y CBS Δ sre1. Para ello, se sembró 5 μ l de cada dilución para realizar la microgota, sobre placas YM-agar suplementadas con los compuestos clotrimazol, ketoconazol o itraconazol en las concentraciones indicadas en la figura. Las diluciones se encuentran en orden creciente hacia la derecha para cada cepa utilizando los distintos compuestos, en el siguiente orden: Sin diluir (0), y diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , indicadas en la figura como -1, -2, -3, y -4 respectivamente.

Como se muestra en la Figura 14, al realizar microgotas de diluciones seriadas de cultivos de las cepas en estudio, al utilizar el compuesto clotrimazol, se observa que la cepa CBS Δ sre1 Δ dap1 presenta un fenotipo similar al de su cepa parental CBS Δ sre1. A la concentración de clotrimazol empleada, CBS Δ sre1 Δ dap1 es incapaz de crecer en ninguna de las diluciones, no así la cepa que solo posee la delección del gen *DAP1* que, si bien su crecimiento respecto a la cepa silvestre se ve disminuido, es capaz de crecer hasta la dilución -1. Al utilizar ketoconazol, ninguna de las cepas mutantes (CBS Δ sre1, CBS Δ dap1 ni CBS Δ sre1 Δ dap1) es capaz de crecer sin mostrar diferencias entre los mutantes. Al utilizar itraconazol, se observa el mismo fenómeno que al utilizar

clotrimazol: la cepa $CBS\Delta sre1$ al igual que $CBS\Delta sre1\Delta dap1$ son incapaces de crecer a la concentración empleada, no así la cepa $CBS\Delta dap1$ que puede crecer hasta la dilución -4, con la aparición de algunas colonias, pero en menor medida que la cepa silvestre.

Utilizando las cepas en estudio, se realizó una curva de crecimiento. Como se observa en la Figura 15, no hay diferencias en el crecimiento entre las cepas empleadas. Luego de 120 h de cultivo (fase estacionaria de crecimiento) se tomó muestras para la extracción y cuantificación de carotenoides y esteroides totales (Figura 15 panel B y C respectivamente).

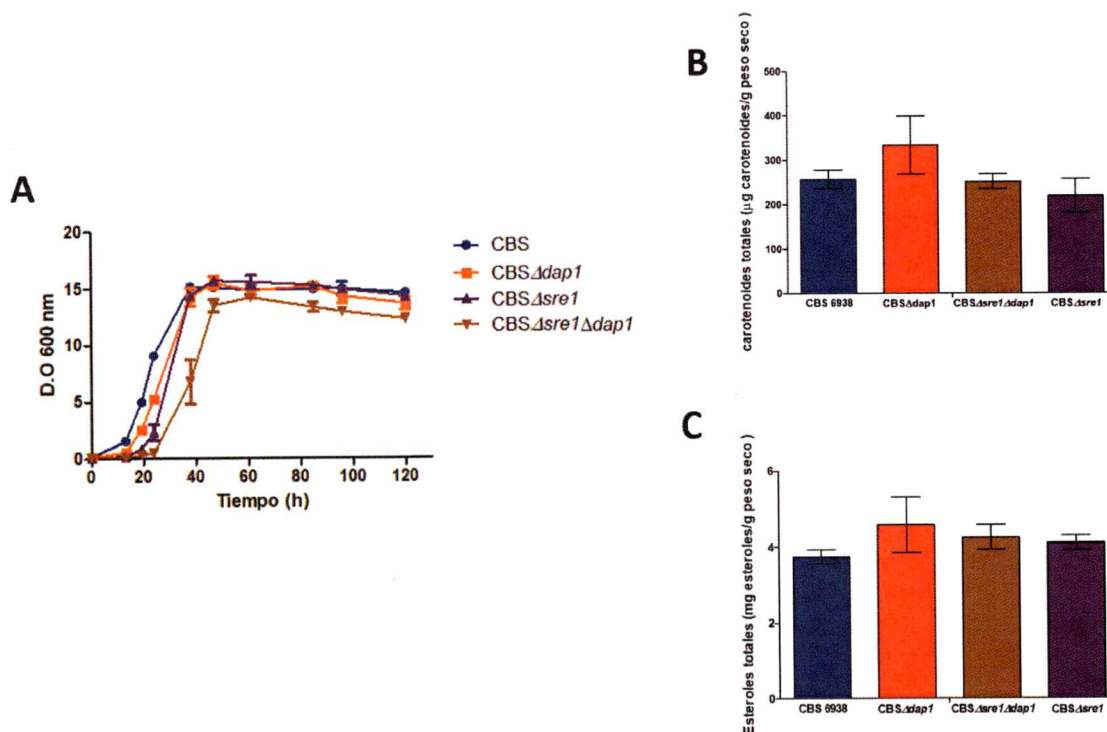


Figura 15. Curva de crecimiento y carotenoides y esteroides totales de las cepas CBS 6938, $CBS\Delta dap1$, $CBS\Delta sre1\Delta dap1$ y $CBS\Delta sre1$. Panel A, curva de crecimiento (hasta 120 h de cultivo) de las cepas en estudio. Panel B, cantidad de carotenoides totales expresados en μg de carotenoides/ g de peso seco. Panel C, cantidad de esteroides totales expresados en mg de esteroides/ g de peso seco. En cada gráfico se indica el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes para cada cepa. Las cepas fueron crecidas por triplicado en matraces de 250 ml con 100 ml de medio YM incubados a 22°C con agitación constante (150 rpm). Anova de una vía

seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas, (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Respecto a los carotenoides y esteroides totales, no existen diferencias significativas entre las cepas en estudio (Figura 15, paneles B y C). Luego, se analizó la composición de estos metabolitos mediante RP-HPLC (Tablas 8 y 9, respectivamente).

Tabla 8. Composición de carotenoides de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1, CBS Δ sre1 Δ dap1 y CBS Δ sre1 luego de 120 h de cultivo.

Carotenoides	CBS 6938	CBS Δ dap1	CBS Δ sre1 Δ dap1	CBS Δ sre1
% Astaxantina	63,9 \pm 3,7 ^a	3,9 \pm 2,1 ^b	2,3 \pm 0,3 ^b	50,3 \pm 12,8 ^a
% Intermediarios de Astaxantina	23,9 \pm 2,7 ^a	41,3 \pm 3,4 ^b	35,5 \pm 0,6 ^a	34,4 \pm 5,9 ^a
% β -caroteno	5,4 \pm 0,9 ^a	50,0 \pm 6,8 ^b	58,6 \pm 1,7 ^b	8,4 \pm 4,2 ^a
% Otros carotenoides	6,8 \pm 0,8 ^a	4,9 \pm 0,7 ^{a,b}	3,7 \pm 0,3 ^b	6,8 \pm 0,9 ^a

La tabla muestra el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes. Intermediarios de astaxantina hace referencia a los intermediarios en la síntesis entre este compuesto y β -caroteno, agrupando a Fenicoxantina, OH-equinenona, equinenona, y cantaxantina. Otros carotenoides hacen referencia a toruleno, OH-k-toruleno y otros carotenoides no identificados. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas. En la tabla se indican las diferencias significativas con $p < 0,01$, donde letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas analizadas para el mismo carotenoide, letras iguales indica que no hay diferencias significativas entre las cepas analizadas para el mismo carotenoide.

Tabla 9. Composición de esteroides de las cepas CBS 6938, CBS Δ dap1, CBS Δ sre1 Δ dap1 y CBS Δ sre1 luego de 120 h de cultivo.

	CBS 6938	CBS Δ dap1	CBS Δ sre1 Δ dap1	CBS Δ sre1
% Ergosterol	97,1 \pm 1,8 ^a	10,4 \pm 2,1 ^b	5,7 \pm 2,2 ^b	99,2 \pm 0,3 ^a
% Esterol ND1	N.O	27,2 \pm 8,0 ^a	8,3 \pm 3,8 ^b	N.O
% Esterol ND2	N.O	62,5 \pm 6,0 ^a	86,1 \pm 1,6 ^b	N.O

La tabla muestra el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes. Esterol ND1 hace referencia a un esteroide no identificado con un tiempo de retención de aproximadamente 14 min, Esterol ND2 hace referencia a un esteroide no identificado con un tiempo de retención de aproximadamente 20 min. N.O: no observado. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas. En la tabla se indican las diferencias

significativas con $p < 0,01$, donde letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas analizadas para el mismo esteroide, letras iguales indica que no hay diferencias significativas entre las cepas analizadas para el mismo esteroide.

No se encontraron diferencias significativas entre las cepas *CBS Δ dap1* y *CBS Δ sre1 Δ dap1* con respecto a la proporción de carotenoides. Sin embargo, se observa una tendencia: la proporción de astaxantina y de carotenoides intermediarios de ésta y β -caroteno, disminuye, y la proporción de β -caroteno aumenta en la cepa *CBS Δ sre1 Δ dap1* respecto a *CBS Δ dap1*. Lo anterior podría explicar el por qué la cepa *CBS Δ sre1 Δ dap1* a simple vista es más clara que *CBS Δ dap1*, lo que podría deberse a que en la primera no hay activación de la vía SREBP y, por ende, no habría activación transcripcional de los genes del sistema P450 (*crtS*) involucrado en el paso de β -caroteno a astaxantina. Ahora, al comparar la cepa *CBS Δ sre1 Δ dap1* respecto a la cepa *CBS Δ sre1*, se observa que la proporción de astaxantina disminuye de un 50,3% a un 2,3%, aproximadamente, observando un cambio inverso cuando se analiza la proporción de β -caroteno (que aumenta de un 8,4% a un 58,6%).

Con respecto a la composición de esteroides, se observó una disminución del contenido de ergosterol en la cepa *CBS Δ sre1 Δ dap1* con respecto a la cepa silvestre CBS 6938 y con respecto a la cepa parental *CBS Δ sre1*. En *CBS Δ sre1 Δ dap1* aparecen los esteroides denominados ND1 y ND2 que corresponden a los obtenidos en la cepa *CBS Δ dap1*, lo cual fue confirmado por co-inyección de las muestras en el equipo (datos no mostrados). Sin embargo, la proporción de estos esteroides en la cepa *CBS Δ sre1 Δ dap1* varía con respecto a la cepa *CBS Δ dap1*, acumulándose en mayor cantidad el esteroide ND2 en la primera cepa.

Si bien la diferencia de la proporción de ergosterol entre las cepas *CBS Δ sre1 Δ dap1* y la cepa *CBS Δ dap1* no es estadísticamente significativa (5,7% vs 10,4%,

respectivamente), si se observa una tendencia a la disminución de éste en la cepa doble mutante, tendencia que se mantuvo en varias repeticiones del mismo experimento (datos no mostrados). Lo anterior, también se podría explicar por una baja en los niveles de transcrito de genes de sistemas P450 involucrados en la síntesis de ergosterol (*CYP51* y *CYP61*) por la ausencia del regulador transcripcional SREBP en la cepa doble mutante.

4. Construcción de cepas con proteínas marcadas con epítomos comerciales mediante la técnica *DNA assembler*.

Para evaluar la posible interacción de *DAP1* con P450s de *X. dendrorhous* mediante Co-iP, se generó una proteína de fusión Dap1 con el epítipo comercial FLAG, ya que no se cuenta con anticuerpos específicos para Dap1. Así mismo, para evaluar la interacción con P450s involucradas en la biosíntesis de esteroides, Cyp61 y Cyp51, se fusionó cada una de estas proteínas con el epítipo HA (Cyp61-3xHA y Cyp51-3xHA respectivamente). A la fecha, no existen vectores episómicos o de expresión para *X. dendrorhous*, por lo que se generó un módulo para reemplazar por recombinación homóloga cada gen endógeno por una copia que exprese a las proteínas de fusión correspondientes con cada epítipo. Para ello, se utilizó la técnica *DNA assembler*, la cual consiste en amplificar mediante PCR fragmentos de DNA con extremos homólogos de tal manera que puedan recombinar entre sí *in vivo* para formar la construcción diseñada; por ejemplo, un plásmido. En este caso, cada fragmento de DNA se amplificó con partidores de 60 pb en donde aproximadamente 40 pb de cada partidor corresponde a "colas homólogas" al fragmento aledaño del vector a generar. Posteriormente, se transformó *S. cerevisiae* con todos los fragmentos para que éstos se ensamblen *in vivo* en la levadura y se genere el vector. Luego de seleccionar los

transformantes, se extrajo DNA con el que se transformó *E. coli* para recuperar el vector construido y finalmente analizarlo. Luego de asegurar que el vector se encontró ensamblado correctamente (mediante PCR, análisis de restricción y secuenciación), el DNA se digirió con una enzima (en este caso *HpaI* de acuerdo con el diseño de los partidores utilizados) para liberar el módulo de recombinación. Con este DNA se transformó *X. dendrorhous* y los transformantes se seleccionaron en medio YM-agar suplementado con el/los antibiótico(s) adecuado(s). Un resumen de la estrategia descrita se muestra en la Figura 16, ejemplificado para el caso de la generación de la cepa CBS Dap1-3xFLAG.

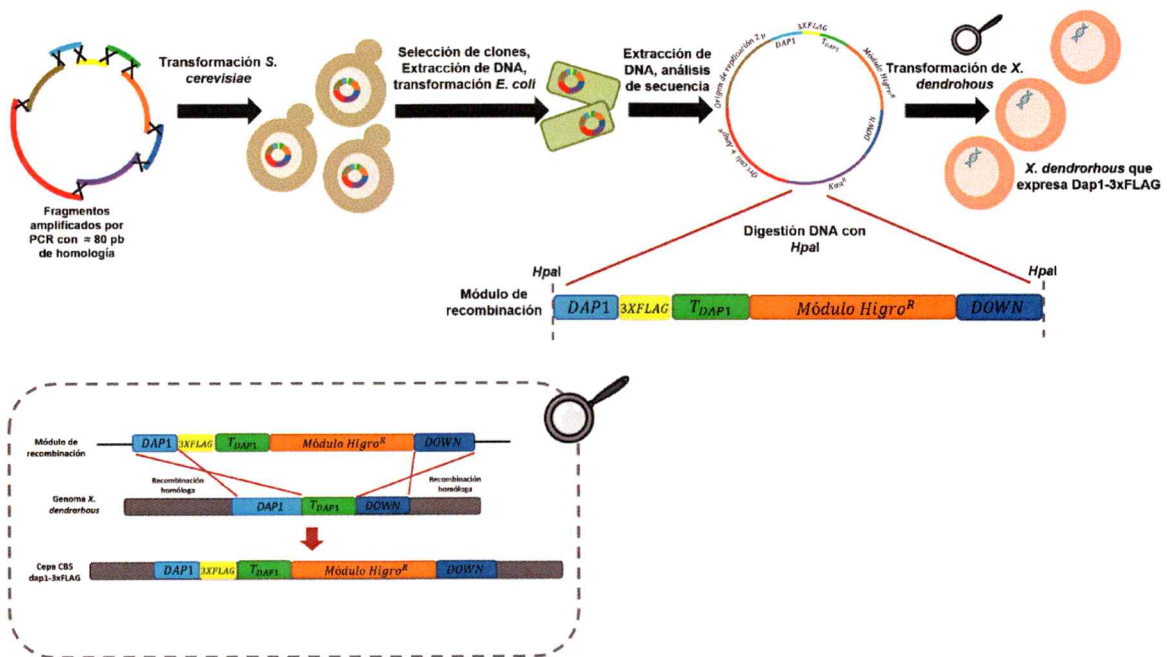


Figura 16. Esquema de la técnica DNA assembler empleada en este trabajo. En la figura, se ejemplifica el caso para la generación de la cepa CBS Dap1-3xFLAG. Fragmentos de DNA con extremos homólogos son amplificados por PCR los que son empleados para transformar *S. cerevisiae*. Los clones transformantes de *S. cerevisiae* son identificados por su resistencia a G-418. El DNA total de clones positivos es utilizado para transformar *E. coli* mediante electroporación para luego recuperar el plásmido construido. Se seleccionan clones de *E. coli* por resistencia a ampicilina, se verifica módulo de resistencia mediante PCR de colonia y se extrae DNA plasmidial, donde se analiza el correcto ensamble del plásmido, seleccionando 1 o 2 para

secuenciar. El vector elegido es digerido con la enzima *HpaI* para liberar el módulo de recombinación, el cual es utilizado para transformar *X. dendrorhous* mediante electroporación. En cuadro con línea punteada, se muestra el evento de doble recombinación homóloga esperado para generar la cepa transformante.

4.1 Construcción de CBS Dap1-3xFLAG mediante la técnica *DNA assembler*.

Primero, se amplificaron los fragmentos de DNA a ensamblar mediante PCR para luego generar el vector. Se amplificó 8 fragmentos de DNA: i) módulo de resistencia a Kanamicina (Kan^R), para poder seleccionar transformantes en *S. cerevisiae* y *E. coli* utilizando los marcadores de selección G-418 y kanamicina respectivamente; ii) origen de replicación de *E. coli* y módulo de resistencia a ampicilina (Amp^R), para poder replicar y seleccionar transformantes en esta levadura; iii) origen de replicación 2 μ para su replicación autónoma en *S. cerevisiae*; iv) la versión genómica de *DAP1* de *X. dendrorhous*, en donde el codón de término de la traducción (*Stop*) fue eliminado de acuerdo con el diseño de los partidores; v) la secuencia que codifica al epítipo 3xFLAG seguido del codón de *Stop*, adicionado nuevamente por PCR a través de los partidores; vi) la región terminadora endógena de *DAP1* en *X. dendrorhous*; vii) módulo de resistencia al antibiótico higromicina B (Higro^R) para la selección de los transformantes en esta levadura; viii) una región denominada como *DOWN* para generar la recombinación en *X. dendrorhous*, la cual corresponde a una región río abajo del gen *DAP1*, para efectivamente reemplazar al *locus DAP1* por la nueva versión diseñada. El tamaño de cada fragmento, y su amplificación por PCR se indican en la Figura 17.

Fragmento	Tamaño (pb)	Tamaño amplificado + colas partidores (pb)
(1) Módulo resistencia Kanamicina (Kan ^R)	1356	1445
(2) Ori <i>E. coli</i> y módulo de resistencia Ampicilina Amp ^R	2918	3003
(3) Origen de replicación 2 μ	1472	1554
(4) DNA genómico <i>DAP1</i>	935	1018
(5) 3XFLAG	69	147
(6) Terminador <i>DAP1</i>	311	392
(7) Módulo de resistencia a Higromicina B (Higro ^R)	1820	1908
(8) DOWN	776	862

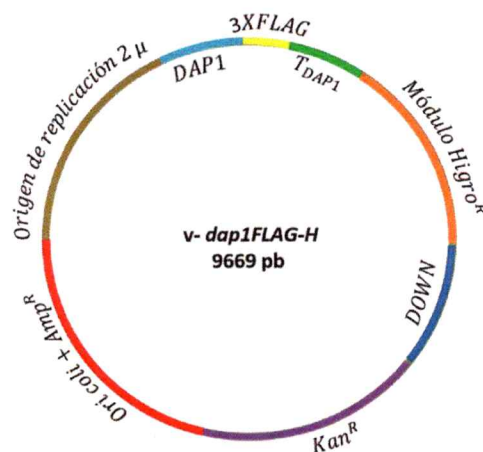
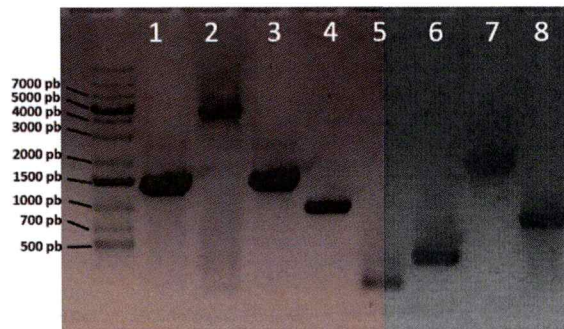


Figura 17. Amplificación de fragmentos para generar al plásmido *v-dap1FLAG-H*. En la imagen, se indican los fragmentos necesarios para la generación del vector *v-dap1FLAG-H* con el tamaño de estos. La amplificación por PCR de cada fragmento (mostrados en la imagen del gel) se correlaciona con los números indicados en la tabla. Abajo, se muestra imagen del vector diseñado y su tamaño. El marcador de peso molecular utilizado corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

Una vez amplificados todos los fragmentos, se transformó *S. cerevisiae*. Se seleccionaron 5 colonias de la levadura resistentes al antibiótico G-418, a las cuales se les extrajo DNA (mediante ruptura mecánica) y se verificó la presencia del módulo de resistencia por PCR (datos no mostrados). Con el DNA extraído de las colonias positivas, se transformó *E. coli* por electroporación. Se seleccionaron los clones resistentes a ampicilina y mediante PCR de colonia se confirmó la presencia del gen *DAP1* fusionado con la secuencia codificante de 3xFLAG. A las colonias seleccionadas se les extrajo el DNA plasmidial y se analizó la correcta inserción de los fragmentos

(Figura 18).

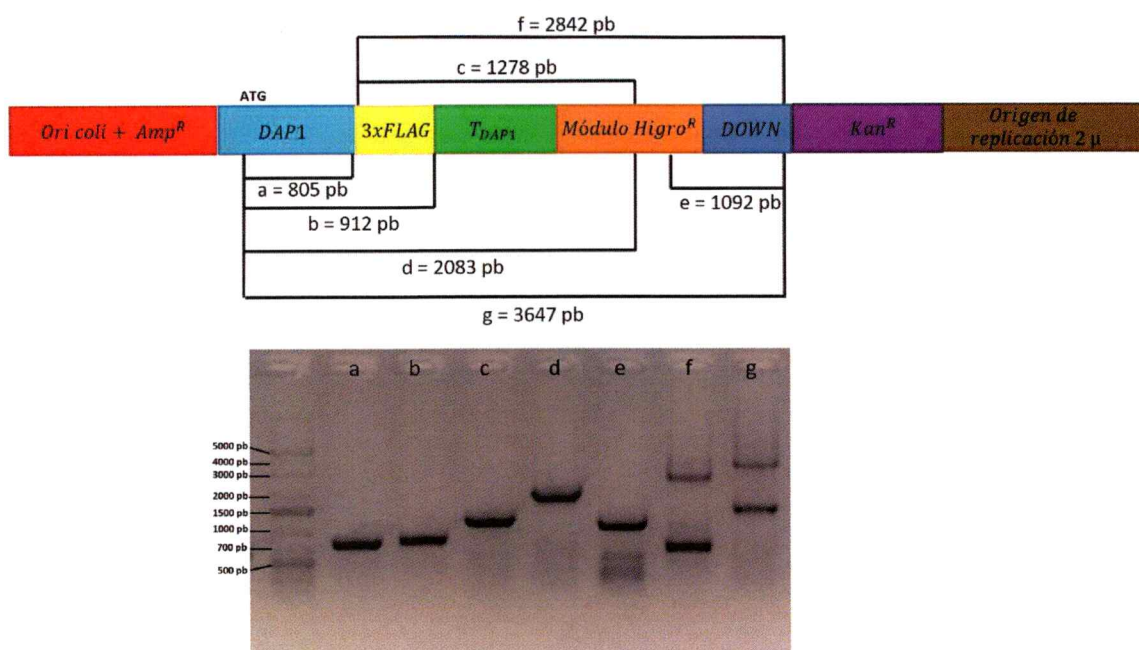


Figura 18. Análisis mediante PCR del plásmido *v-dap1FLAG-H*. En la imagen, se muestra el análisis por PCR del DNA plasmidial de uno de los clones obtenidos. Las letras a-g indican el fragmento amplificado de acuerdo con el modelo, donde se señala el tamaño esperado para cada caso. El marcador de peso molecular utilizado corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

De los clones analizados, se seleccionaron 2 clones (provenientes de transformaciones con el DNA de colonias diferentes de *S. cerevisiae*) los cuales se analizaron para confirmar que la secuencia génica de *DAP1* estuviera correctamente fusionada con la secuencia que codifica al epítipo 3xFLAG. Los resultados de la secuenciación indicaron que uno de los plásmidos poseía una delección de 6 nucleótidos de la secuencia 3xFLAG, por lo que fue descartado. Sin embargo, la secuencia del plásmido recuperado del segundo clon era la esperada, por lo que fue utilizado para experimentos posteriores (datos no mostrados). El vector resultante se denominó *v-dap1FLAG-H*.

El vector *v-dap1FLAG-H* se digirió con la enzima *HpaI* para liberar el módulo de recombinación del plásmido y se transformó la cepa CBS 6938 de *X. dendrorhous*. Los transformantes fueron seleccionados por su crecimiento en medio YM-agar suplementado con el antibiótico higromicina B. Luego, las colonias de *X. dendrorhous* transformantes se evaluaron por PCR analizando; por ejemplo, que la secuencia de 3xFLAG y del módulo de resistencia a higromicina B se encontraran presente en la cepa generada, entre otros (Figura 19).

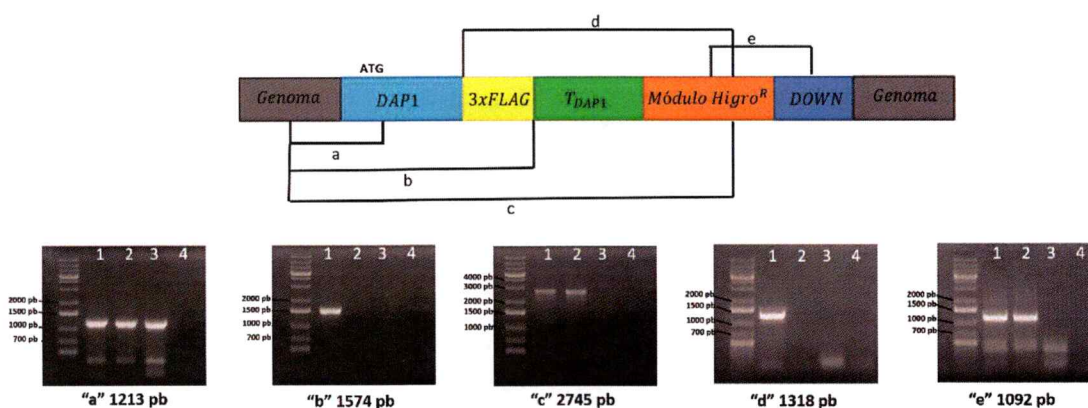


Figura 19. Análisis de clones transformantes de *X. dendrorhous* para la generación de la cepa CBS Dap1-3xFLAG. En la imagen, se muestran algunos análisis por PCR realizados para dos posibles clones (denominados como cl1 y cl2) para la generación de la cepa con la proteína Dap1 marcada con 3xFLAG. Como DNA molde se utilizó DNA de: clon cl1 (carril 1), clon cl2 (carril 2), cepa silvestre CBS 6938 (carril 3) y agua como control negativo (carril 4). El marcador de peso molecular utilizado corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

El transformante de *X. dendrorhous* seleccionado se denominó CBS Dap1-3xFLAG (cl1), el cual no presenta diferencias fenotípicas de pigmentación con la cepa silvestre como era esperado.

4.2 Construcción de CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA mediante la técnica *DNA assembler*.

Para poder evaluar si Dap1 es capaz de interactuar con las P450s involucradas en la biosíntesis de ergosterol Cyp61 y Cyp51, se construyeron cepas que poseen cada una de estas proteínas fusionadas con el epítipo comercial HA (por separado) a partir de la cepa CBS Dap1-3xFLAG. Al igual que en el caso anterior, se utilizó la técnica *DNA assembler* para construir los vectores y luego modificar el genoma de la levadura, introduciendo las copias de ambos genes fusionadas con la secuencia que codifica el epítipo HA en el mismo *locus* original, manteniendo el promotor y terminador endógeno de cada gen (*CYP51* o *CYP61*). En ambos casos, el fragmento de DNA con la secuencia 3xHA se generó mediante PCR, ya que no se contaba con un plásmido con dicha secuencia para amplificar. Para ello, se utilizó OE-PCR de dos partidores de 60 pb con una región complementaria de 27 pb entre ellos.

Los vectores obtenidos luego por *DNA assembler*, recuperados y analizados a partir de *E. coli*, se denominaron *v-CYP61HA-Z* para el caso de *CYP61* y *v-CYP51HA-Z* para el caso de *CYP51*, los cuales poseían un tamaño de 10.724 pb y 10.674 pb, respectivamente. Ambos plásmidos fueron digeridos con la enzima *HpaI* para liberar el módulo de recombinación y se transformó (por separado) la cepa CBS Dap1-3xFLAG con ambos. Los clones transformantes fueron seleccionados por su resistencia a los antibióticos higromicina B y zeocina. Una vez analizados mediante extracción de DNA y PCR, se seleccionó uno de cada uno para realizar los experimentos posteriores, denominado a cada cepa como CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA. En la Figura 20 se muestran los vectores generados y análisis realizados para cada una de las cepas. Las cepas generadas no presentaron diferencias fenotípicas con la cepa parental CBS Dap1-3xFLAG ni con la cepa silvestre CBS 6938.

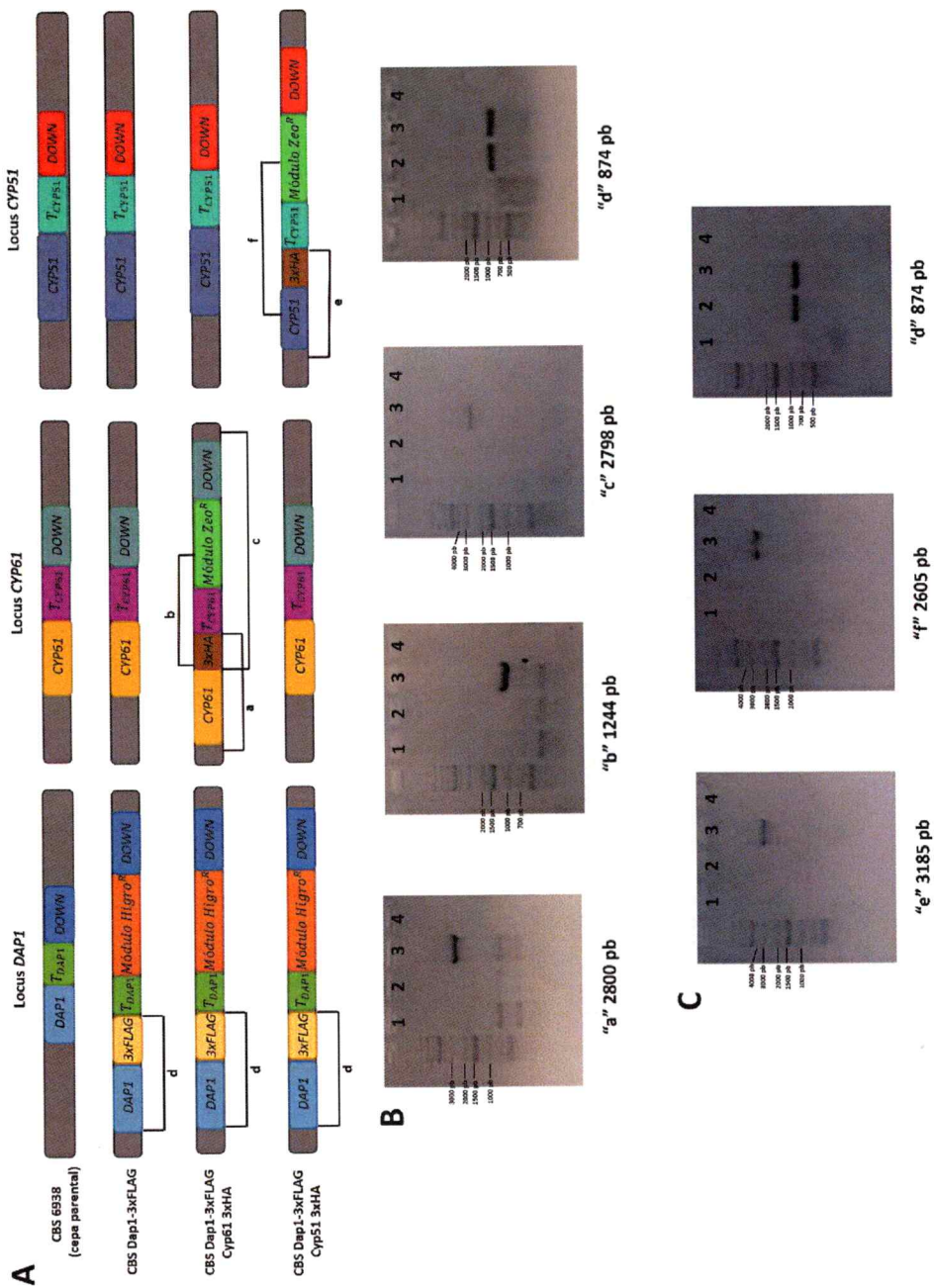


Figura 20. Análisis mediante PCR de las cepas CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA. Panel A, esquema de la amplificación por PCR realizada. Panel B, productos de PCR del análisis de la cepa CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA. Carriles 1) CBS 6938, 2) CBS Dap1-3xFLAG, 3) CBS Dap1 3xFLAG Cyp61 3xHA y 4) control negativo (-). Panel C, productos de PCR para del análisis de la cepa CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA. Carriles 1) CBS 6938, 2) CBS Dap1-3xFLAG, 3) CBS Dap1 3xFLAG Cyp51 3xHA; 4) control negativo (-). El marcador de peso molecular utilizado corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

5. Evaluación de proteínas marcadas en *X. dendrorhous*

Una vez obtenidas las cepas transformantes, se evaluó la producción de cada proteína de fusión mediante *western blot*. Para ello, se realizó extracción de proteínas utilizando perlas de vidrio en un molidor de células, mediante 7 ciclos de ruptura mecánica. Las cepas utilizadas corresponden a: i) CBS 6938, ii) CBS Dap1- 3xFLAG, iii) CBS Dap1- 3xFLAG Cyp61-3xHA y iv) CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA. El extracto de proteínas total obtenido de cada cepa se analizó en un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (Figura 21). Luego de observar que la extracción de proteínas totales fue exitosa, se realizaron ensayos de *western blot* para confirmar la presencia de las proteínas marcadas con los epítomos (Figura 21).

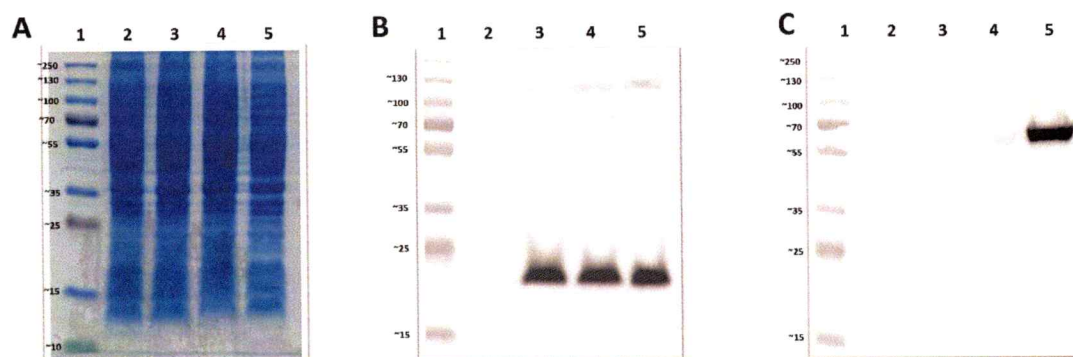


Figura 21. SDS-PAGE y *western blot* de las cepas CBS 6938, CBS Dap1-3xFLAG, CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA. Panel A, SDS-PAGE de extractos totales de proteínas obtenidos por ruptura mecánica de las cepas en estudio. Panel B, *western blot* utilizando extractos proteicos de las cepas en estudio, donde la membrana fue incubada con el anticuerpo primario anti-FLAG 1:1000 y anticuerpo secundario anti-mouse HRP 1:5000. Panel C, *western blot* utilizando extractos proteicos de las cepas en estudio, donde la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-HA 50 mU. En todos los casos, el carril 1 corresponde al Ladder de proteínas PageRuler™ Plus, carril 2: extracto de proteínas de la cepa CBS 6938, carril 3: extracto de proteínas de la cepa CBS Dap1-3xFLAG, carril 4: extracto de proteínas de la cepa CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y carril 5: extracto de proteínas de la cepa CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA. Para todos los casos se utilizó un gel de poliacrilamida al 10%.

Como se observa en la Figura 21, panel A, se obtuvo extractos de proteínas de todas las cepas en estudio. Al realizar *western blot* e incubar la membrana con anti-FLAG, fue posible observar una banda que se encuentra entre los 15 y 25 kDa aproximadamente, en todos los extractos (carril 3, 4 y 5) excepto en el de la cepa parental CBS 6938 (carril 2). Esto concuerda con lo esperado, ya que el peso molecular estimado de la proteína Dap1-FLAG corresponde a 21,3 kDa, y en la cepa parental no es posible observar dicha banda ya que la proteína Dap1 no se encuentra marcada con el epítipo FLAG (Figura 21, panel B). Al incubar la membrana con anti-HA (Figura 21, panel C), se observan dos bandas, entre los 55 y 70 kDa en los carriles 3 y 4, lo que concuerda con lo esperado, ya que estos carriles corresponden a extractos proteicos de las cepas CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA, respectivamente. Se puede observar que la banda observada en el carril 4 es levemente de mayor tamaño y más intensa que la obtenida en el carril 3, lo que coincide con lo esperado, ya que el tamaño esperado de la proteína Cyp61-3xHA corresponde a 63,052 kDa y el de Cyp51-3xHA a 65,159 kDa.

De esta manera, se logró obtener cepas de *X. dendrorhous* que producen las proteínas de fusión Dap1-3xFLAG, Cyp61-3xHA y Cyp51-3xHA, las cuales pueden ser detectadas con los anticuerpos respectivos mediante *western blot*.

6. Ensayos de interacción proteína-proteína entre Dap1 y las P450s Cyp61 y Cyp51.

Para evaluar la interacción proteína-proteína entre Dap1 y las P450s involucradas en la biosíntesis de ergosterol, se realizó ensayos de Co-inmunoprecipitación (Co-iP). Para

ello, extractos proteicos de las cepas CBS 6938, CBS Dap1- 3xFLAG, CBS Dap1- 3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1- 3xFLAG Cyp51-3xHA fueron utilizados. Cada extracto fue incubado toda la noche con el anticuerpo anti-FLAG, esperando por tanto que éste reconozca a FLAG presente en las cepas CBS Dap1-3xFLAG, CBS Dap1- 3xFLAG Cyp61-3xHA y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA. Luego, cada extracto incubado con anti-FLAG fue incubado con las perlas magnéticas unidas a proteína A/G, reteniendo por tanto al complejo *perlas-anti-FLAG-Dap1-3xFLAG* y permitiendo su separación. De cada extracto, se separaron tres fracciones: Fracción *Input* (FI) que corresponde al extracto de proteínas utilizado para realizar las Co-iPs pero sin pasar por el proceso, Fracción *Unbound* (FU) que corresponde al sobrenadante recuperado luego de separar las perlas, es decir, todo lo que no se unió a las perlas magnéticas y no fue separado, y por último la Fracción *Bound* (FB), que corresponde a lo retenido por las perlas magnéticas, es decir, el complejo anticuerpo-proteína reconocida.

El mismo procedimiento fue realizado utilizando el anticuerpo mouse IgG1. Este anticuerpo posee el mismo isotipo que anti-FLAG (IgG1) y fue utilizado para evaluar que la interacción entre el epítipo FLAG y el anticuerpo es específica, y que el reconocimiento no se encuentra mediado por la región constante.

Finalmente, se realizó un *western blot* para ver la presencia de las proteínas de interés en las distintas fracciones. Se utilizaron tres anticuerpos: Anti-FLAG, para evaluar si la inmunoprecipitación fue efectiva. Anti-HA, para evaluar si Dap1 interactúa con las P450 en estudio marcadas con el epítipo HA y por tanto, retenidas también al realizar la Co-iP, y por último se utilizó Anti-Ubiquitina. Ubiquitina debería estar presentes en todas las fracciones excepto en la FB, ya que esta proteína no debería interactuar con Dap1. Un

resumen de lo expuesto se indica en la Figura 22.

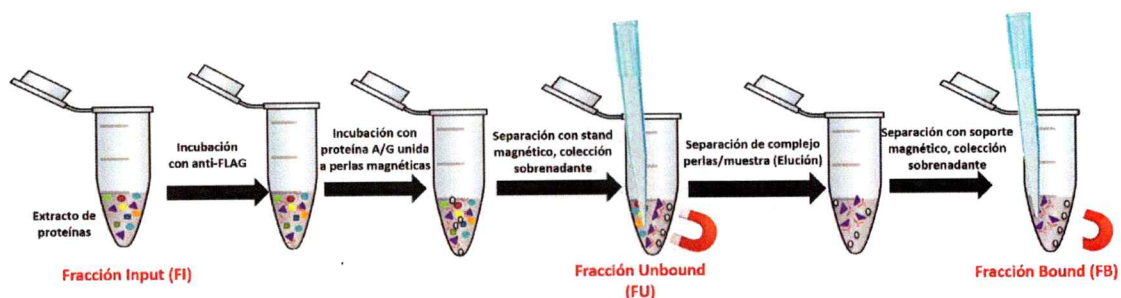


Figura 22. Protocolo empleado para realizar las co-immunoprecipitaciones (Co-iP).

En la imagen, se indican las etapas necesarias para llevar a cabo las Co-iPs. Se colectaron tres fracciones: Fracción *Input* (FI), que corresponde al extracto de proteínas de cada cepa en estudio que fue empleado para las Co-iPs, Fracción *Unbound* (FU) que corresponde al sobrenadante una vez realizada la incubación con el anticuerpo y las perlas magnéticas, y por último la Fracción *Bound* (FB) que posee las proteínas atrapadas por las perlas magnéticas.

Primero se evaluó la interacción entre Dap1-3xFLAG y Cyp61-3xHA (Figura 23).

Como se puede observar, al realizar la Co-iP utilizando el anticuerpo anti-FLAG, es posible visualizar a la proteína en las cepas marcadas, es decir en las cepas Dap1-3xFLAG y Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA. En ambos casos se observa que la proteína se puede visualizar en las tres fracciones: FI (carril 4 y 7), lo que indica que había proteína al inicio del experimento; FU (carril 5 y 6), que indica que no toda la proteína Dap1-3xFLAG fue capturada por las perlas-proteína A/G, por tanto, quedando proteína marcada en el sobrenadante. Por último, se observa en la fracción FB, indicando que la inmunoprecipitación fue exitosa y se logró atrapar a la proteína con el método empleado. Luego se analizó si la proteína Cyp61-3xHA co-precipita con Dap1-3xFLAG, lo cual solo es posible observar en los extractos proteicos de la cepa Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA. Como se visualiza en la Figura 23, es posible observar la proteína en las tres fracciones:

carriles 7, 8 y 9. En el carril 7 (FI), se observa que la proteína efectivamente se encuentra presente en el extracto total de proteínas de la cepa, antes de realizar en el experimento. En el carril 8 (FU), al igual que en el caso anterior se observa una banda, lo que nos indica que queda proteína en el sobrenadante. Finalmente, en el carril 9 (FB), se observa una banda, lo que indica que Cyp61-3xHA co-precipita con Dap1-3xFLAG. Estos resultados indican que la proteína Dap1 de *X. dendrorhous* interactúa con la proteína P450 Cyp61, ya que es posible detectar el complejo Dap1-Cyp61 mediante Co-iP.

Para verificar que el procedimiento fue llevado a cabo de manera correcta y no hubo contaminación de otras proteínas en el proceso de purificación, se evaluó la presencia de la proteína ubiquitina en las distintas fracciones (Figura 23). De acuerdo con la literatura, no existen reportes de unión de Dap1 con esta proteína, por lo que no debería co-eluir en este experimento, que es lo que ocurre (carriles 3, 6 y 9, que corresponde a la fracción FB de todas las cepas).

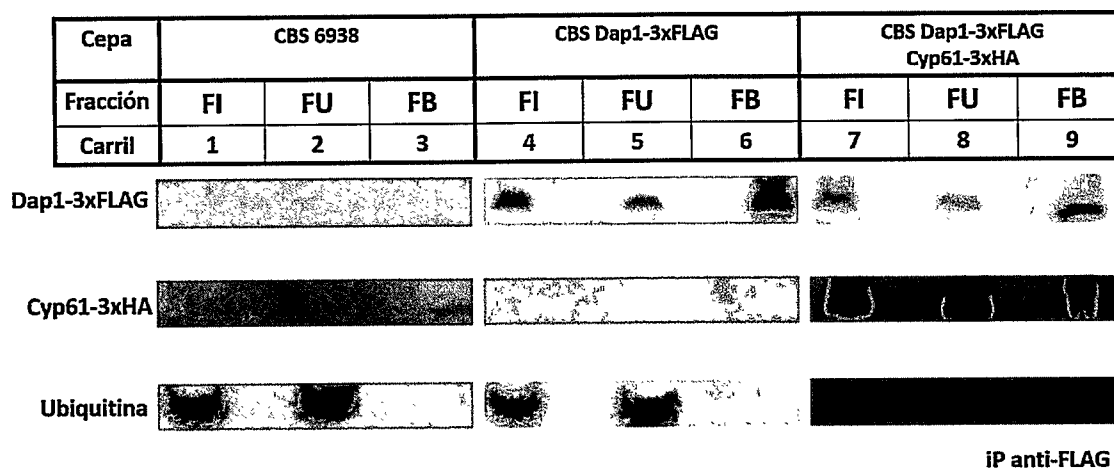


Figura 23. Co-iP de proteínas de las cepas CBS 6938, CBS Dap1-3xFLAG y CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA. En la imagen, se indican las distintas fracciones obtenidas para cada cepa en estudio. En todos los casos, la inmunoprecipitación se realizó utilizando el anticuerpo anti-FLAG. Para la visualización de las proteínas, se utilizó geles de

poliacrilamida al 15% para Dap1- 3xFLAG y ubiquitina, y geles al 10% para la visualización de Cyp61-3xHA.

Como control, para evaluar que la interacción entre el epítipo FLAG y el anticuerpo respectivo es específica, se utilizó el anticuerpo anti-mouse IgG1 el cual posee el mismo isotipo que anti-FLAG, IgG1. Como se observa en la Figura 24, al realizar la inmunoprecipitación utilizando este anticuerpo, no hay inmunoprecipitación: no se observa la proteína Dap1-3xFLAG (Figura 24, carril 3). Así mismo, ya que no hubo inmunoprecipitación, no co-eluye Cyp61-3xHA (Figura 24, carril 3).

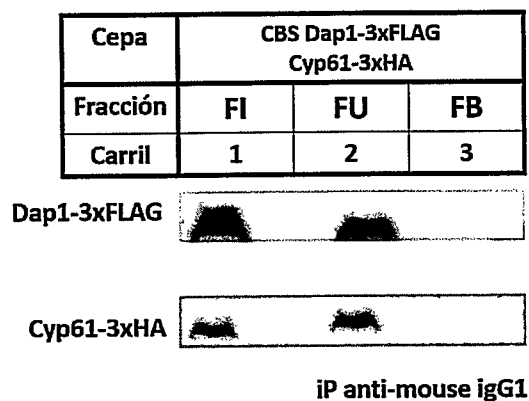


Figura 24. Co-iP de proteínas de la cepa CBS Dap1-3xFLAG Cyp61-3xHA utilizando el anticuerpo anti-mouse IgG1. En la imagen, se indican las tres fracciones obtenidas para la cepa en estudio. Para la visualización de las proteínas, se utilizó geles de poliacrilamida al 15% para Dap1- 3xFLAG y geles al 10% para la visualización de Cyp61-3xHA.

Lo siguiente a evaluar fue si la proteína Dap1-3xFLAG y Cyp51-3xHA interactúan. Para ello, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 25.

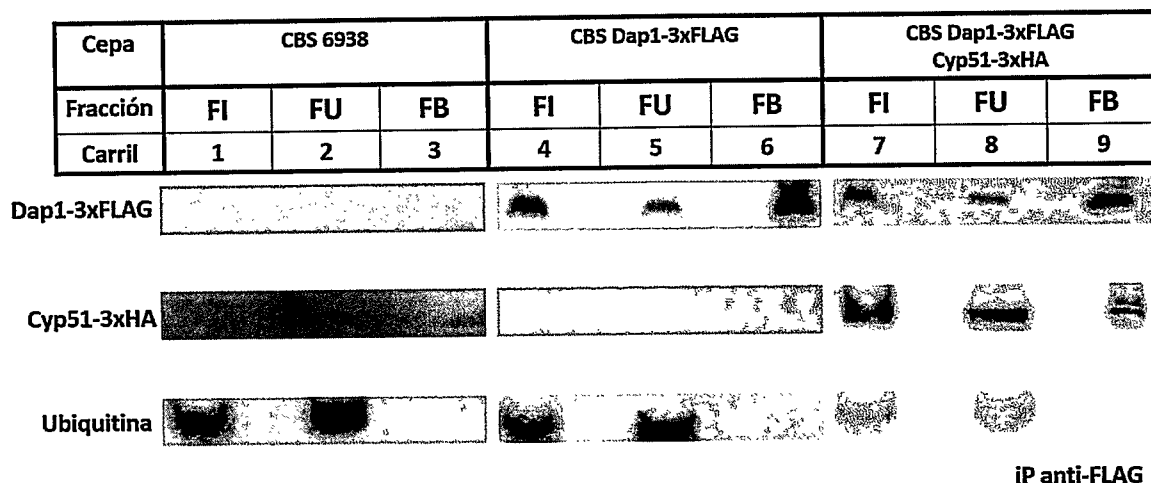


Figura 25. Co-iP de proteínas de las cepas CBS 6938, CBS Dap1-3xFLAG y CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA. En la imagen, se indican las distintas fracciones obtenidas para cada cepa en estudio. En todos los casos, la inmunoprecipitación se realizó utilizando el anticuerpo anti-FLAG. Para la visualización de las proteínas, se utilizó geles de poliacrilamida al 15% para Dap1- 3xFLAG y ubiquitina, y geles al 10% para la visualización de Cyp51-3xHA.

Al igual que en el caso anterior, se observa la proteína Dap1-3xFLAG solo en los ensayos de *western blot* de extractos proteicos de las cepas que poseen la proteína marcada con el epítipo y en las tres fracciones del ensayo de Co-iP: FI (carril 4 y 7), lo que nos indica que había proteína al inicio del experimento; FU (carril 5 y 6), que indica que quedó proteína que no fue capturada por las perlas-proteína A/G, quedando por tanto proteína marcada en el sobrenadante. Se visualiza que la inmunoprecipitación de Dap1-3xFLAG se logró, ya que la proteína se encuentra en el carril 6 y 9, que corresponde a la fracción FB. Al utilizar el anticuerpo anti-HA para marcar a Cyp51, podemos observar solo reconocimiento en la cepa donde la proteína se encuentra marcada, cepa Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA, y en las tres fracciones. De acuerdo con los resultados obtenidos, Cyp51-3xHA co-precipita con Dap1-3xFLAG (Figura 25, carril 9), indicando que estas proteínas

interactúan de manera proteína-proteína.

Al analizar la presencia de ubiquitina en los extractos, se observa que esta proteína se encuentra presentes en las fracciones FI y FU de todos los extractos, no así en la fracción FB como es esperado, ya que Dap1 no interactúa con ella.

Finalmente, al realizar la inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo anti-mouse igG1 no se observa la proteína Dap1-3xHA en los extractos, y por ende, tampoco Cyp51-3xHA, lo que indica que la interacción entre el epítipo y el anticuerpo es específica (Figura 26).

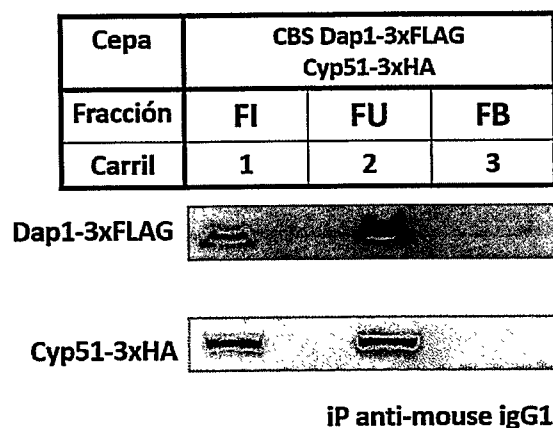


Figura 26. Co-iP de proteínas de la cepa CBS Dap1-3xFLAG Cyp51-3xHA utilizando el anticuerpo anti-mouse IgG1. En la imagen, se indican las tres fracciones obtenidas para la cepa en estudio. Para la visualización de las proteínas, se utilizó geles de poliacrilamida al 15% para Dap1- 3xFLAG y geles al 10% para la visualización de Cyp51-3xHA.

DISCUSIÓN

Los sistemas P450s microsómicos se encuentran conformados por una enzima citocromo P450 y un *partner redox* encargado de donar electrones para llevar a cabo la acción catalítica de la P450, que corresponde a una CPR (llamada CrtR en *X. dendrorhous*). En *X. dendrorhous*, se han caracterizado funcionalmente tres P450s: dos implicadas en la biosíntesis esteroides, Cyp51 y Cyp61, y una implicada en la biosíntesis de carotenoides, CrtS. Dado que la síntesis de esteroides es fundamental para la célula para mantener la permeabilidad e integridad de la membrana, se ha observado que mutantes *crtR* de la levadura pueden utilizar el sistema CYB5-CBR como donador de electrones, donde los electrones necesarios son obtenidos a partir del NADH (Gutiérrez y col., 2015). De acuerdo con la información disponible, solo se conocía que CPR y CYB5 son capaces de interactuar con P450s. Estudios recientes han identificado un elemento adicional, la proteína Dap1, que podría interactuar con proteínas P450 para regular su actividad. En este trabajo, se identificó y caracterizó un posible homólogo a esta proteína en la levadura *X. dendrorhous*. De acuerdo con los resultados bioinformáticos obtenidos, la proteína Dap1 de *X. dendrorhous* codificaría a una proteína que posee un segmento transmembrana en su extremo N-terminal, con un posible dominio tipo citocromo b5 que le permitiría unir hemo, en donde se encuentra conservada una tirosina esencial para la coordinación de este grupo (Figura 4) (Ghosh y col., 2005). El grupo hemo sirve como un grupo prostético en proteínas

de unión a este compuesto como la hemoglobina o citocromos, siendo importante para el transporte, transferencia de electrones o para funciones de señalización (Kimura y col., 2012). La proteína Dap1 de *X. dendrorhous* se encontraría anclada en el retículo endoplásmico, lo que concuerda con lo esperado y lo obtenido por otros grupos de trabajo (Ryu y col., 2017). Así, en relación con los resultados obtenidos, la secuencia del gen identificado como *DAP1* en *X. dendrorhous* sería un buen candidato que codificaría una proteína perteneciente a la familia de las MAPR y por este motivo, se procedió a evaluar su funcionalidad mediante la construcción de mutantes.

El mutante *CBSΔdap1* presentó cambios en la pigmentación de la levadura, siendo ésta mucho más anaranjada que su cepa parental, CBS 6938 (Figura 7A). Esto podría deberse a que la ausencia de esta proteína en la levadura afectaría la actividad de la enzima astaxantina sintasa (CrtS), la cual cataliza el último paso en la biosíntesis de astaxantina: la conversión de β -caroteno en astaxantina. De acuerdo con los resultados obtenidos, la delección de *DAP1* disminuyó el porcentaje de astaxantina a un 3% aproximadamente incrementándose a su vez la proporción de β -caroteno (Tabla 4), lo que afirma la hipótesis que la delección de *DAP1* afectaría la actividad de CrtS, ya que se acumula principalmente el sustrato de esta enzima. Interesantemente, en el mutante *CBSΔdap1* la proporción de astaxantina disminuyó, pero sigue produciéndose este compuesto, no así en el mutante CBSTr. En esta última cepa, la secuencia del gen que codifica al principal donador de

electrones de P450, CrtR, se encuentra interrumpida de tal modo que no se genera una proteína funcional. Se conoce que la enzima CrtS utiliza exclusivamente como donador de electrones a CrtR, por lo que la interrupción de su gen afecta completamente la actividad de CrtS y, por tanto, no se produce astaxantina, lo que no se observa en el mutante *CBS Δ dap1*. Esto indicaría que Dap1 es necesario, pero no indispensable para la actividad de CrtS.

Así mismo, la composición de esteroides en la cepa *CBS Δ dap1* se ve alterada. El ergosterol, el principal esteroide producido por la levadura *X. dendrorhous* se ve disminuido drásticamente a un 7% aproximadamente en el mutante (Tabla 5). *CBS Δ dap1* acumula otros dos esteroides (ND1 y ND2, Tabla 5), que corresponden a esteroides también producidos por la cepa CBSTr. Esto indica que, al igual que en cepa CBSTr, la delección de *DAP1* probablemente afecta la funcionalidad de las P450s implicadas en la síntesis de ergosterol, como las ya estudiadas y caracterizadas en esta levadura, Cyp51 y Cyp61. Interesantemente, la ausencia de CrtR genera una disminución en la producción de ergosterol, pero no de manera tan drástica como en el mutante *CBS Δ dap1*. Probablemente, esto se deba a que en *X. dendrorhous* existe el sistema CBR-CYB5 (Gutiérrez y col., 2015), permitiendo mantener un nivel de ergosterol de alrededor de un 80%. Al no encontrarse Dap1, el cual modularía la actividad de las P450s antes descritas, generaría un efecto mucho más drástico, el cual, aparentemente, no podría ser suplido por otro sistema.

Dada la alteración en la composición de esteroides, la cepa CBS Δ *dap1* es más sensible a compuestos azólicos como clotrimazol, ketoconazol e itraconazol (Figura 7). A pesar de que el mecanismo de acción de estos compuestos es similar (el nitrógeno del azol compite por oxígeno con la molécula de hierro del grupo hemo en el sitio catalítico de la P450), la afinidad de cada compuesto por el sustrato varía, y por ende la inhibición ejercida (Bailey y col., 1990). De esta manera, la ausencia de Dap1 aumentaría la sensibilidad a compuestos azólicos por una pérdida en la actividad de las P450s implicadas, en particular por la enzima Cyp51.

En relación con los análisis de los niveles de transcrito, estudios realizados en *S. cerevisiae* han mostrado que la delección de *DAP1* no afecta los niveles de transcrito de la P450 Cyp51, no así los niveles de proteína, que en el mutante se ven disminuidos (Mallory y col., 2005). Esto difiere con lo obtenido en el mutante CBS Δ *dap1*, donde los niveles de transcrito de las P450s CrtS, Cyp51 y Cyp61 y del donador de electrones CrtR se encuentran aumentados en comparación con la cepa silvestre CBS 6938 (Figura 10). Esta diferencia en los estudios reportados podría explicarse en la activación de la vía SREBP en *X. dendrorhous*, vía implicada en la regulación de la homeostasis de esteroides en mamíferos y en otras levaduras como *S. pombe*. Como se indicó en la Tabla 5, el mutante CBS Δ *dap1* disminuye la proporción de ergosterol, lo que podría estar activando esta vía y, por ende, favoreciendo la transcripción de sus genes blanco que presumiblemente podrían ser los de

las P450s analizadas. De hecho, se han identificado secuencias SRE (secuencia de unión del factor transcripcional Sre1) en la hebra positiva en la región promotor de los genes de Cyp51 y Cyp61 (Córdova y col., 2017), lo que podría explicar este aumento en los niveles de transcrito en la cepa CBS Δ dap1. Esto puede no haberse observado en *S. cerevisiae* debido a que en este microorganismo la regulación de los niveles de ergosterol en la célula no se encuentra dado por la vía SREBP, sino por un mecanismo compuesto por los factores transcripcionales Upc2p y Ecm22p (Vik y Rine., 2001) de otra familia. A pesar del aumento en los niveles de transcrito de todas las P450s caracterizadas funcionalmente en *X. dendrorhous*, esto parece ser insuficiente para mantener los niveles de ergosterol y astaxantina silvestres en la cepa CBS Δ dap1, los cuales se encuentran disminuidos notoriamente (Tabla 4 y 5).

Como se ha mencionado en los antecedentes, la unión de hemo por PGRMC1/Dap1 es la única función biológica conocida para esta proteína. En la levadura *S. cerevisiae*, se observó que la adición exógena de este compuesto era suficiente para revertir el fenotipo alterado en la composición de esteroides en mutantes Δ dap1, fenómeno que fue analizado por cromatografía de gas (Mallory y col., 2005), sugiriendo que Dap1 se encuentra implicado en el transporte de hemo funcionando como una especie de chaperona para las P450s. De esta manera, se analizó el efecto de la adición exógena de este compuesto en el mutante CBS Δ dap1. Como se observa en la Figura 11, en cuanto a la pigmentación de

esta cepa, al adicionar concentraciones crecientes de hemina, el fenotipo de color no cambia, por lo que la adición exógena de hemina no mejora la actividad de la P450, CrtS, implicada en este mutante. Caso opuesto se observa cuando la cepa es crecida con clotrimazol: el adicionar este compuesto permite el crecimiento normal de la cepa, similar a lo obtenido por la cepa silvestre, lo que podría indicar por tanto que la adición exógena de hemina mejoraría la actividad de las P450s implicadas en esta vía. Sin embargo, cuando se analizó por RP-HPLC la composición de esteroides, la proporción de ergosterol no aumenta notablemente (Tabla 7), sino que aparecen nuevos esteroides denominados como ND3, ND4 y ND5, los cuales actualmente no se encuentran identificados. Se ha caracterizado que la resistencia a azoles en otros hongos como *C. albicans* puede ser mediada por un cambio en la composición de esteroides en la membrana plasmática, aumentando la proporción de esteroides no esterificados impidiendo la entrada del azol a la célula (Marichal y Bossche., 1995). Los nuevos esteroides generados en la cepa CBS Δ dap1 (cuando se adiciona hemina) podrían estar mediando un cambio en la composición de esteroides en la membrana que explicaría la mayor resistencia a este tipo de compuestos.

De acuerdo con Hughes y col., 2007, uno de los blancos del factor transcripcional Sre1 en *S. pombe* corresponde al gen de la proteína Dap1. En el hongo *A. fumigatus*, se observó que el factor transcripcional SREBP (denominado SrbA en este hongo) es requerido para la correcta expresión de DapA (Dap1 en *X. dendrorhous*) en presencia del

azol itraconazol, donde el doble mutante (*srbA-* y *dapA-*) hace a la cepa más sensible a este compuesto (Song y col., 2017). El mutante CBS Δ *sre1* Δ *dap1* de *X. dendrorhous*, al igual que en *A. fumigatus*, es más sensible a los azoles utilizados en este trabajo (Figura 14). Presumiblemente, la presencia de azoles resulta en la activación y translocación al núcleo de Sre1 debido a un cambio en la composición de esteroides. De esta manera, se induciría la expresión de genes blancos como *CYP51* que responde ante el bloqueo de la actividad de esta enzima debido a la droga. En la cepa CBS Δ *sre1* Δ *dap1*, ya que el factor transcripcional Sre1 no se encuentra en la célula, esta respuesta no ocurriría, por lo que dicha cepa no puede responder ante la presencia de azoles y, por ende, aumentaría su sensibilidad a estas drogas cuando se la compara con la cepa silvestre o CBS Δ *dap1*. Junto con esto, a simple vista se observó un cambio en la pigmentación de la cepa CBS Δ *sre1* Δ *dap1* en comparación con la cepa CBS Δ *dap1*, siendo la primera más clara y amarilla que la segunda. El cambio en la pigmentación puede deberse a que no estaría ocurriendo el efecto de aumento de los niveles de transcrito de *crtS* (gen que codifica a la P450 involucrada en la conversión de astaxantina a partir del β -caroteno), debido a la activación de la vía SREBP dada por la ausencia de *Dap1*; por tanto, disminuiría la proporción de astaxantina y aumentaría la de β -caroteno resultando en un fenotipo más amarillo como es lo observado. Sin embargo, no se vieron diferencias estadísticamente significativas en la composición de carotenoides (Tabla 8) pese a que el promedio de la

proporción de astaxantina es menor en el mutante CBS Δ sre1 Δ dap1 que en CBS Δ dap1 y el de β -caroteno mayor, tendencia observada en varias repeticiones del experimento (datos no mostrados).

Finalmente, en relación con las Co-iP realizadas con el anticuerpo anti-FLAG que se reconoce al epítipo fusionado a Dap1, se puede afirmar que efectivamente Dap1 de *X. dendrorhous* interactúa con las P450s Cyp51 y Cyp61 de esta levadura, similar a lo obtenido por Hughes y col., 2007 en *S. pombe*. Esta interacción es específica, ya que no existe co-inmunoprecipitación cuando se revela con un anticuerpo contra otra proteína (anti-ubiquitina). De esta manera, la actividad de Dap1 sobre las P450s implicaría una interacción proteína-proteína que, de acuerdo con los resultados, no sería solo el traspaso de hemo, ya que la adición exógena de este compuesto no revierte el fenotipo observado. Nuevos estudios son necesarios para analizar si Dap1 es capaz de interactuar con otras P450s como CrtS, lo cual no se logró antes de la realización de esta tesis, así como también evaluar si la unión de hemo es necesario para la actividad de esta proteína.

CONCLUSIONES

- El gen identificado como *DAP1* codificaría una proteína perteneciente a la familia MAPR, la cual posee el dominio tipo citocromo b5 conservado.
- La delección del gen *DAP1* afecta la composición de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*, sugiriendo un rol regulatorio sobre las P450s implicadas en sus vías de síntesis.
- Las enzimas P450s involucradas en la biosíntesis de esteroides Cyp61 y Cyp51 Co-inmunoprecipitan con Dap1, sugiriendo que la interacción proteína-proteína entre Dap1 y las P450s es requerida para la funcionalidad de estas enzimas de *X. dendrorhous*.

REFERENCIAS

Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, Niklitschek M, Sepúlveda D, Baeza M, Cifuentes V. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (*criR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol*, **8**: 169.

An G, Schuman 'D, Johnson E. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol*, **55**(1):116-124.

Bailey E, Krakovsky D, Rybak M. (1990). The triazole antifungal agents: a review of itraconazole and fluconazole. *Pharmacotherapy*, **10**(2): 146-153.

Bien C, & Espenshade P. (2010). Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryot Cell*, **9**(3): 352-359.

Britton S, Liaaen-Jensen S, Pfander H. (2004). Carotenoids Handbook. Springer Science & Business Media. Basel, Switzerland.

Córdova P, González A, Nelson D, Gutiérrez M, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. (2017). Characterization of the cytochrome P450 monooxygenase genes (P450ome) from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Genomics*, **18**(1): 540.

Črešnar B, Petrič Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochim Biophys Acta*, **1814**(1): 29-35.

Estabrook R. (2003). A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos*, **31**(12): 1461-1473.

Ghosh K, Thompson A, Goldbeck R, Shi X, Whitman S, Oh E, Zhiwu Z, Vulpe C, Holman T. (2005). Spectroscopic and biochemical characterization of heme binding to yeast Dap1p and mouse PGRMC1p. *Biochemistry*, **44**(50): 16729-16736.

Gibson D. (2009). Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, **37**(20): 6984-6990.

Gómez M. (2017). Caracterización estructural y funcional del gen *STP1* codificante de una S2P (site-2 protease) involucrada en la vía de regulación SREBP de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

González A. 2016. Efecto de la delección del gen del factor transcripcional Sre1 en la expresión de sus genes blanco en la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Gutiérrez M, Rojas M, Sepúlveda D, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. (2015). Molecular characterization and functional analysis of cytochrome b5 reductase (CBR) encoding genes from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *PLoS one*, **10(10)**: e0140424.

Gutiérrez, M. (en Progreso). Caracterización de la vía SREBP dependiente de los niveles de ergosterol y oxígeno en la biosíntesis de carotenoides y ergosterol en *X. dendrorhous* (Tesis de Doctorado). Universidad de Chile, Ñuñoa, Santiago.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166(4)**: 557-580.

Hughes A, Powell D, Bard M, Eckstein J, Barbuch R, Link A, Espenshade, P. (2007). Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metab*, **5(2)**: 143-149.

Joska T, Mashruwala A, Boyd J, Belden W. (2014). A universal cloning method based on yeast homologous recombination that is simple, efficient, and versatile. *J Microbiol Methods*, **100**: 46-51.

Kabe Y, Nakane T, Koike I, Yamamoto T, Sugiura Y, Harada E, Sugase K, Shimamura T, Ohmura M, Muraoka K, Yamamoto A, Uchida T, Iwata S, Yamaguchi Y, Krayukhina E, Noda M, Handa H, Ishimori K, Uchiyama S, Kobayashi T, Suematsu M. (2016). Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nat Commun*, **7**: 11030.

Kimura I, Nakayama Y, Konishi M, Terasawa K, Ohta M, Itoh N, Fujimoto M. (2012). Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins. *Curr Protein Pept Sci*, **13(7)**: 687-696.

Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, **25(4)**: 402-408.

Loto, I, Gutiérrez M, Barahona S, Sepúlveda D, Martínez-Moya P, Baeza M, Cifuentes, V, Alcaíno, J. (2012). Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol*, **12(1)**: 235.

Mallory J, Crudden G, Johnson B, Mo C, Pierson C, Bard M, Craven R. (2005). Dap1p, a heme-binding protein that regulates the cytochrome P450 protein Erg11p/Cyp51p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **25(5)**: 1669-1679.

Marichal P, Bossche H. (1995). Mechanisms of resistance to azole antifungals. *Acta Biochim Pol*, **42(4)**: 509-516.

McLean K, Sabri M, Marshall K, Lawson R, Lewis D, Cliff D, Balding P, Dunford A, Warman A, McVey J, Quinn A, Sutcliffe M, Scrutton N, Munro A. (2005). Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem Soc Trans*, **33(4)**: 796-801.

- Oldenburg K, Vo K, Michaelis S, Paddon C. (1997). Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res*, **25(2)**: 451-452.
- Piel R, Shiferaw M, Vashisht A, Marcero J, Praissman J, Phillips, Wohlschlegel J, Medlock A. (2016). A novel role for progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): a partner and regulator of ferrochelatase. *Biochemistry*, **55(37)**: 5204-5217.
- Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente J, Barredo J. (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl Microbiol Biotechnol*, **88(3)**: 645-658.
- Rohe H, Ahmed I, Twist K, Craven R. (2009). PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol Ther*, **121(1)**: 14-19.
- Ruckenstuhl C, Lang S, Poschenel A, Eidenberger A, Baral P, Kohút P, Turnowsky F. (2007). Characterization of squalene epoxidase of *Saccharomyces cerevisiae* by applying terbinafine-sensitive variants. *Antimicrob Agents Chemother*, **51(1)**: 275-284.
- Ryu C, Klein K, Zanger U. (2017). Membrane associated progesterone receptors: promiscuous proteins with pleiotropic functions—focus on interactions with cytochromes P450. *Front Pharmacol*, **8**: 159.
- Sambrook J, Russel D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shao Z, Zhao H, Zhao, H. (2008). DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Res*, **37(2)**: e16.
- Song J, Zhai P, Zhang Y, Zhang C, Sang H, Han G, Keller N, Lu L. (2016). The *Aspergillus fumigatus* damage resistance protein family coordinately regulates ergosterol biosynthesis and azole susceptibility. *MBio*, **7(1)**: e01919-15.
- Song J, Zhai P, Lu L. (2017). Damage resistance protein (Dap) contributes to azole resistance in a sterol-regulatory-element-binding protein SrbA-dependent way. *Appl Microbiol Biotechnol*, **101(9)**: 3729-3741.
- Vik Å, Rine J. (2001). Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **21(19)**: 6395-6405.